

LDL 受容体 LRP1B の機能解析

城島 知子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座

(川市 正史 教授)

平成 21 年 3 月 17 日提出

目次

序論	4-11
材料と方法	12-25
結果	26-47
1. LRP1B 遺伝子の単離	
1-1. P19 細胞の神経分化過程において、LRP1B 遺伝子の発現は上昇する	
2. LRP1B 遺伝子の発現解析	
2-1. 成体マウスにおける LRP1B 遺伝子の発現部位	
2-2. 成体マウスの脳における LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の発現比較	
3. LRP1B 遺伝子欠失マウスの作製	
4. LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの探索	
5. LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクと LRP1 細胞内ドメイン或いは LRP1B 細胞内ドメイン選択的スプライシングにより生じたエクソン 89 と 91 から構成されるアイソフォームとの結合確認	
6. JIP-1b	
6-1. LRP1B と JIP-1b は、動物細胞内で結合する	
6-2. LRP1B と JIP-1b は共局在する	
6-3. LRP1B エクソン 91 内 NPxY モチーフと JIP-1b PTB ドメインが結合する	
6-4. LRP1B と JIP-1b の結合は、JNK シグナル経路に影響しない	
7. RanBPM	
7-1. LRP1B と RanBPM は、動物細胞内で結合する	
7-2. RanBPMはLRP1B細胞内ドメインの特定配列を認識して結合しない	
7-3. LRP1B と RanBPM の結合は、MAP キナーゼ経路に影響しない	

7-4. LRP1B と RanBPM の結合は、転写活性に影響しない

8. Grb7

8-1. Grb7 はエクソン 91 の NPxY モチーフ変異体に結合しない

9. SNTG2

9-1. LRP1B の C 末端 3 アミノ酸残基は SNTG2 との結合に必須である

10. PICK1

10-1. LRP1B と PICK1 は、動物細胞内で結合する

10-2. LRP1B と PICK1 は共局在する

10-3. LRP1B の C 末端 3 アミノ酸残基と PICK1 の PDZ ドメインが結合する

10-4. PICK1 は LRP1B の内在化に影響する

10-5. LRP1B は *in vitro* で PKC α によりリン酸化される

10-6. PICK1 は PKC α による LRP1B のリン酸化を阻害する

図と表	48-83
考察	84-93
謝辞	94
参考文献	95-109

序論

LRP1B (LDL (low density lipoprotein) receptor -related protein 1B)の単離

本研究室では、神経初期発生に関与する新規遺伝子の単離を行ってきた。マウス胚性ガン細胞株である P19 細胞は、培養条件により様々な形態の細胞へと分化することが知られている(McBurney, 1993)。P19 細胞は、分化条件により内胚葉や中胚葉由来の細胞への分化も示すが、レチノイン酸の添加と凝集により神経外胚葉由来の神経細胞・アストログリア・ミクログリアへの分化誘導を引き起こす性質を持っている(Bain et al., 1994)。この P19 細胞の神経分化を引き起こす性質を利用して、神経分化誘導後に発現の上昇が見られる遺伝子の単離を cDNA RDA (Representation Difference Analysis)法を用いて行った。

RDA 法とは本来、遺伝病等により引き起こされる染色体の欠落や差異を検出するために開発された方法である。この原理を mRNA 由来の cDNA を用いて行えるように改良された方法が、cDNA RDA 法である(Hubank and Schatz, 1994)。これは比較する 2 つの細胞集団間での遺伝子発現の差異を検出するための方法である。神経分化初期に発現が誘導される遺伝子の単離を目的として、神経分化誘導後の P19 細胞由来の cDNA と未誘導の P19 細胞由来の cDNA を用いて、cDNA RDA 法を行った。

その結果、神経分化初期に関連する可能性を有する 51 の遺伝子断片を単離し、BLAST 検索を行ったところ、19 の未解明の遺伝子断片を含んでいた。これら遺伝子断片の 1 つが LRP1B 遺伝子由来のものであった。RT-PCR 法を用いて、LRP1B 遺伝子の発現が、P19 細胞のレチノイン酸の添加と凝集による神経分化誘導後に上昇することを確認している。

LRP1B は、LDL 受容体ファミリーに属しており、線虫からマウス・ヒトに至るまで広く保存されている。LRP1B 遺伝子はマウス・ヒトともに 2 番染色体長腕に位置しており、cDNA サイズ 16kbp、4599 個のアミノ酸からなる 600kDa にも及ぶ巨大なタンパクである。LRP1B は、細胞外に 4449aa、膜貫通領域に 17aa、細胞内に 133aa を有している。

LDL 受容体ファミリー

LDL 受容体ファミリーは、哺乳類において、LDLR (LDL receptor)、VLDLR (very low-density lipoprotein (VLDL) receptor)、ApoER2 (Apolipoprotein E receptor 2)、

MEGF7 (multiple epidermal growth factor -like domain 7)、LRP1 (LDL receptor -related protein 1)、LRP1B、megalin の7つの中核となるメンバーから構成されている。この中核となる LDL 受容体ファミリーは、細胞外にシステインを6残基含む約40アミノ酸残基から構成されるリガンド結合ドメイン、EGF (epidermal growth factor)前駆体相同ドメイン、1つの細胞膜貫通ドメイン、細胞内に1つ以上のシグナル伝達やエンドサイトーシス誘起を司る NPxY (Asp -Pro -any amino acid -Tyr)モチーフを共通して保持している。また、厳密には構造要件を満たしていないが、中核となる LDL 受容体と近縁関係にある LRP5 (LDL receptor -related protein 5)、LRP6 (LDL receptor -related protein 6)、LR11 (11 LDL receptor ligand binding repeats)を加えた10のタンパクをまとめて、LDL 受容体ファミリーと総称されている(Herz and Bock, 2002)。

LDL 受容体ファミリーの根本的な機能は、脂質の輸送とコレステロールホメオスタシスである。大多数の動物細胞は、受容体を介したエンドサイトーシスによりコレステロールを取り込み、膜の生合成に必要な大部分のコレステロールを供給している。コレステロールは、小腸により吸収された食事由来の外因性のものと、肝臓で合成された内因性のものがある。血中でこれらコレステロールは、リポタンパクとして存在している。リポタンパクは、トリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの中性脂質を核とし、その表面をアポリポタンパク、リン脂質、及び遊離コレステロールで覆われた小粒子であり、血液中に安定な輸送体として存在する。リポタンパクは、その粒子の大きさ・アポリポタンパクと脂質の比率の違いにより、キロミクロン・VLDL・IDL (intermediate density lipoprotein)・LDL・HDL (high density lipoprotein)・VHDL (very high-density lipoprotein)に分けられる。血中で主要なリポタンパクである LDL の細胞内への取り込みは、リポタンパク表面に存在するアポリポタンパクが細胞膜表面に存在する LDL 受容体ファミリーのメンバーにより認識・結合されることにより起こる(赤沼安夫 et al., 1993)。

また近年、LDL 受容体ファミリーのシグナル伝達系への関与が注目されている。

例えば VLDLR と ApoER2 は、発生期にシグナル伝達の仲介をして神経系の構築に関与することが知られている。VLDLR 遺伝子と ApoER2 遺伝子の個々の欠損マウスは、著しい表現型を示さない(Frykman et al., 1995), (Trommsdorff et al., 1999)。しかし、これらの2重欠損マウスは、細胞外分泌タンパク Reelin の機能

欠失マウスや Disabled-1 タンパクの欠失したマウスと同様の表現型を呈する (Trommsdorff et al., 1999)。また、神経細胞移動の終点にある細胞から細胞外に分泌される reelin は、VLDLR や ApoER2 の受容体に結合すると、これら受容体の細胞内で結合している Disabled-1 の Src ファミリーによる活性を一過性に促し、さらに下流にある PI3 キナーゼ(phosphoinositide 3-kinase)カスケードを活性化する (D'Arcangelo et al., 1999) (Hiesberger et al., 1999) (Trommsdorff et al., 1999) (Beffert et al., 2004)。これらの知見より VLDLR と ApoER2 は、細胞外の Reelin シグナルを細胞内アダプタータンパク Disabled-1 へと伝達すると考えられる。さらにそのシグナルは、Disabled-1 の下流に存在するリン酸化カスケードを経て細胞骨格を制御し、最終的に細胞の位置を決定しているものと考えられている (Herz and Chen, 2006)。

また LRP5 と LRP6 は、Wnt シグナル経路に関与することが知られている。Wnt シグナル経路は、細胞外分泌タンパク Wnt が Flizzled ファミリーに結合し、Dishevelled や axin などの細胞内シグナル伝達因子を経て、DNA 結合タンパクの TCF ファミリーと結合する β -catenin を安定化することで転写を活性化し、形態形成・細胞増殖・形質転換（ガン化）など多岐にわたる機能に関連している (He et al., 2004)。LRP6 遺伝子欠損マウスは、Wnt-3a, Wnt-1, Wnt-7a の遺伝子をそれぞれ欠失したものと類似した表現型を示す (Pinson et al., 2000)。また LRP6 の細胞外ドメインは Wnt-1 と結合し、Wnt に依存して Flizzled と結合する (Tamai et al., 2000)。また LRP6 は、Wnt-Flizzled 伝達系を活性化させ、下流にある遺伝子の発現を誘導する (Tamai et al., 2000)。これらの知見より LRP5 と LRP6 は、Wnt シグナル経路において、Wnt の受容体として知られている Flizzled に対する共働受容体として機能し、形態形成・細胞増殖・形質転換（ガン化）などに関わる Wnt シグナル経路の必須成分であると考えられている (He et al., 2004)。

LRP1 の機能

LRP1B は、LDL 受容体ファミリーの中でも特に、タンパクの大きさ・構造上 LRP1 と類似している。LRP1 は、他の LDL 受容体ファミリーと同様に、コレステロールの代謝に関連していると考えられるが、シグナル伝達への関与や Alzheimer's disease (AD) との関連が報告されている。

LRP1 は、Calreticulin と共に TSP1 (Thrombospondin-1) の受容体として機能する。TSP1 は、血小板により分泌され血液凝固に関与し、また腫瘍細胞からも分

泌され細胞移動にも関与することが知られている。TSP1 の LRP1/Calreticulin を介したシグナルは、三量体 G タンパクを経て、PI3 キナーゼや ERK (extracellular signal -related kinase)を活性化し、結果的に細胞運動を誘導する(Orr et al., 2003a), (Orr et al., 2003b), (Lillis et al., 2008)。

血管平滑筋細胞の増殖と遊走は、アテローム性動脈硬化の進行に関係する重要な現象である。LRP1 は PDGFR (PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) 受容体) と複合体を形成する。マウスの血管平滑筋細胞での LRP1 の不活化は、PDGFR の過剰な発現と PDGF シグナルの異常な活性化を起こし、その結果、血管平滑筋細胞の増殖、動脈瘤の形成、およびコレステロール誘導によるアテローム性動脈硬化が誘起される(Boucher et al., 2003)。

LDL 受容体ファミリーによる脂質の代謝のリガンドとして機能するアポリポタンパク E の遺伝子多型は、AD の危険因子である(Strittmatter et al., 1993)。また LRP1 は細胞外領域で、AD 原因遺伝子 APP (β アミロイド前駆体タンパク)の全長、APP の α -secretase 或いは β -secretase による分解産物である sAPP α や sAPP β と結合し、細胞内に取り込む受容体として機能している(Kounnas et al., 1995) (Knauer et al., 1996)。また LRP1 は細胞内領域で、FE65 を介して APP と間接的に結合しており、APP の内在化の促進や APP の β -secretase と γ -secretase による分解産物である A β (β アミロイド)産生亢進に関与している(Ulery et al., 2000)。

また、APP の γ -secretase による分解産物である APP 細胞内ドメイン(AICD)は、FE65、ヒストンアセチルトランスフェラーゼである Tip60 と複合体を形成し転写調節に関与する(Cao and Sudhof, 2001)。そしてこの複合体の転写調節の標的の 1 つが LRP1 であり、LRP1 の転写を抑制している(Liu et al., 2007b)。

LRP1 は、細胞外に分泌された A β の排除への関与も報告されている。A β は、LRP1 に直接、或いは LRP1 のリガンドであるアポリポプロテイン E や活性型 α 2 -macroglobulin と複合体を形成し、LRP1 の内在化と共に細胞内に取り込まれる(Deane et al., 2004) (Yang et al., 1999) (Qiu et al., 1999)。

LRP1 が AD の危険因子ではないかとの議論もある。LRP1 のエクソン 3 内にある多型において、LRP1 の発現量の低下や血漿中の A β の亢進見られ、孤発性の AD の発症との関連が報告された(Kang et al., 1997) (Kang et al., 2000)。

以上の事実などにより LDL 受容体ファミリーは、コレステロールの代謝以外にもいくつもの機能を有することが示唆されている。

LRP1Bの既知機能

LRP1Bは、2000年にLiu et al.により初めて報告された遺伝子で、LRP-DIT (lipoprotein receptor-related protein-deleted in tumors) と名付けられた(Liu et al., 2000a)。LRP1は、多くの組織で発現しているが、とりわけ肝臓において強く発現しており、脳においても発現している(Bu et al., 1994)。一方、マウスLRP1Bは、若干甲状腺や唾液腺での発現が見られるが、ほぼ中枢神経に特異的な発現を示す(Liu et al., 2001)。

LRP1Bは、非小細胞肺癌の細胞株の半数近くで、ホモ接合欠失や点変異の遺伝子変異が起きており、異常な転写産物の生産や転写の不活性が起きている。このことから、LRP1Bは、非小細胞肺癌の腫瘍形成に関与する可能性が報告されている(Liu et al., 2000b)。LRP1B遺伝子の変化は、膀胱癌（尿路上皮腫瘍）においても見つかっており、組織学的異型度の高い腫瘍においてLRP1Bのヘテロ接合欠失やホモ接合欠失が頻繁に起こっているため、LRP1Bの発現の変化は、腫瘍の浸潤や転移に関連していると考えられている(Langbein et al., 2002)。また、食道扁平上皮癌や口腔扁平上皮癌においては、LRP1B遺伝子の遺伝学的な機構よりもむしろDNAメチル化修飾による発生上での遺伝子機能変化の機構により、LRP1Bの遺伝子発現停止が起こる結果、ガン化の方向へと向かうことが報告されている(Sonoda et al., 2004) (Nakagawa et al., 2006)。また、実際にLRP1Bは、グリア細胞腫の増殖を抑制するとの報告もある(Liu et al., 2007a)。この様に、LRP1Bは、ガン抑制遺伝子の候補と考えられている。この現象は、ガン細胞で多く発現し、ガンの浸潤や転移に関わっているuPA (urokinase plasminogen activator)とPAI-1 (plasminogen activator inhibitor type-1)が、LRP1Bのリガンドであることと関連していると考えられる(Liu et al., 2001)。uPAは、細胞外基質の分解を促進することで癌細胞の局所浸潤や遠隔転移に影響を与えることが知られている。このようなuPAの作用の多くはその受容体であるuPA receptor (uPAR)を介しており、このuPAとuPARの相互作用に対して阻害的に働く物質としてPAI-1が知られている。PAI-1はuPAに直接的或いはuPAとuPARの複合体に作用することで、uPA活性を調節している。このことからPAI-1は癌細胞の進展を抑制すると考えられてきた。LRP1Bが、uPA, PAI-1に結合することで、uPA, PAI-1, uPAR複合体を細胞内に取り込む結果、uPA, PAI-1は分解され、一部uPARは再び細胞膜上へと輸送される。LRP1Bの内在化は、LRP1の内在化に比べて非常に遅いため、uPA, PAI-1, uPAR複合体の内在化、続くuPARの細胞膜上への再利用に支障をきたす。

結果的にLRP1Bは、細胞移動を阻害し、腫瘍の悪性を抑制している(Li et al., 2002)。

LRP1B の機能は、未だ未解明な点が多い。動脈硬化巣に発現する LRP1B は、uPAR や PDGFR の代謝を促進することで、血管平滑筋細胞の遊走を抑制し、動脈硬化の予防に関わる可能性がある(Tanaga et al., 2004) (Seki et al., 2005)。

以上の点から LRP1B も、他の LDL 受容体ファミリー同様、シグナル伝達に関与している可能性がある。そこで本研究では、LRP1B が関与するシグナル伝達を調べるため、yeast two-hybrid スクリーニングを用いて、LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの探索を行った。さらに、単離した LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクと LRP1B の結合による、シグナル伝達への影響を調べた。

LDL 受容体ファミリー遺伝子欠損マウス

LDL 受容体ファミリーは、リポタンパクの代謝やシグナル伝達への関与が報告されている。これらの LDL 受容体ファミリーの機能解析において、各 LDL 受容体ファミリー遺伝子欠損マウスの作製とそれらの表現型解析は、重要な役割を担ってきた。

LDLR 遺伝子欠損マウスは、正常に誕生し、生殖能力に異常はない。このマウスの血漿中の中性脂肪値は正常であるが、コレステロール値は同腹兄の 2 倍程度高く、高コレステロール血症の表現型を引き起こす(Ishibashi et al., 1993)。

VLDLR 遺伝子欠損マウスは、正常に誕生し、生殖能力に異常はない。またこのマウスは、若干の体重減少が見られるが、コレステロールや中性脂肪の代謝を含め、顕著な表現型を示さない(Frykman et al., 1995)。

ApoER2 遺伝子欠損マウスは、正常に誕生する。このマウスは、メスの生殖能力に異常はないが、オスの生殖能力低下が見られる以外に顕著な表現型を示さない(Trommsdorff et al., 1999)。

VLDLR 遺伝子と ApoER2 遺伝子の二重欠損マウスは、リーラーマウスや Reelin の下流に発現している Disabled-1 遺伝子欠損マウスの表現型と類似している。リーラーマウスは、自然発症による神経変異マウスで、細胞外分泌タンパク Reelin の機能を失い、行動学的所見として、よろめき歩行等の小脳性運動失調を示し、組織学的所見として大脳と小脳の層形成等に異常をきたす。これらの所見により、ApoER2 と VLDLR は、細胞外分泌タンパク Reelin の受容体であり、大脳や小脳の層形成等に重要な役割を果たしていることが示唆された

(Trommsdorff et al., 1999)。

Megf7 遺伝子欠損マウスは、正常に誕生し、生殖能力に異常はない。このマウスは、切歯の形成異常や前肢・後肢ともに多合指症の表現型を示す(Johnson et al., 2005)。

LRP1 遺伝子欠損マウスは、肝形成不全のため胎性致死である(Herz et al., 1992), (Roebroek et al., 2006)。また、中枢神経特異的 LRP1 遺伝子欠損マウスは、組織学的異常は見られないが、運動亢進・振戦・ジストニアといった行動学的異常が見られる(May et al., 2004)。

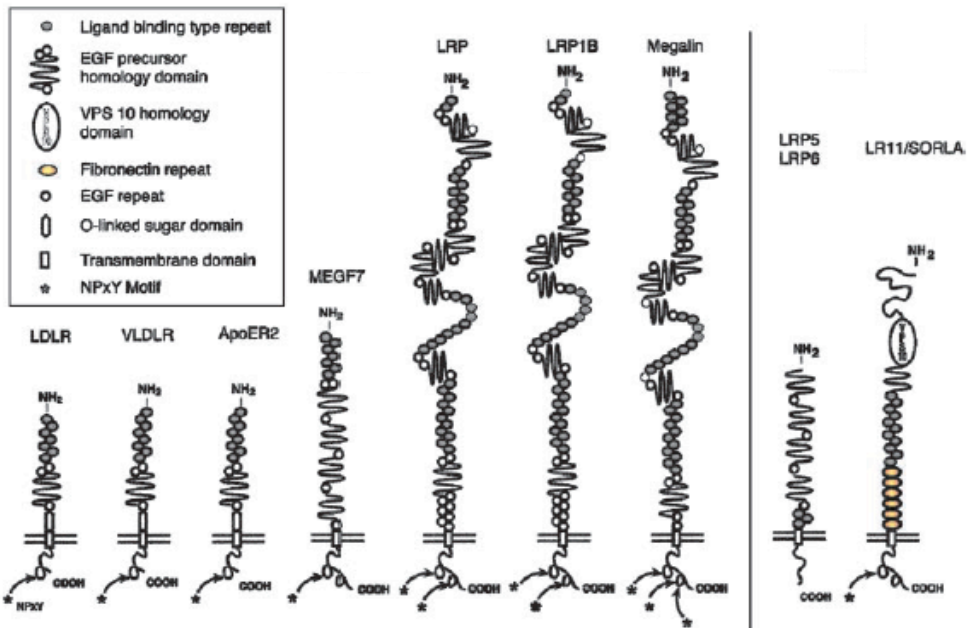
megalin 遺伝子欠損マウスは、出生直後に肺泡拡大による呼吸不全で死亡する。またこのマウスは、嗅球の欠失・前脳の未融合の中枢神経系での表現型も有している(Willnow et al., 1996)。

LRP5 遺伝子欠損マウスは、頭頂骨や頸骨に骨密度の低下が観察されたが、形態・行動・繁殖は正常である(Kato et al., 2002)。しかしこのマウスは、肝臓での食事由来のコレステロール輸送を担うカイロミクロンレムナントの取り込みの顕著な減少や、インスリン分泌不全による耐糖能の著しい低下が見られた(Fujino et al., 2003)。

LRP6 遺伝子欠損マウスは、胎性致死である。このマウスは、腰部体節の欠損・中脳や小脳の欠失・四肢背腹極性の消失といった Wnt-3a, Wnt-1, Wnt-7a の遺伝子をそれぞれ欠失したものと類似した表現型を示す(Pinson et al., 2000)。

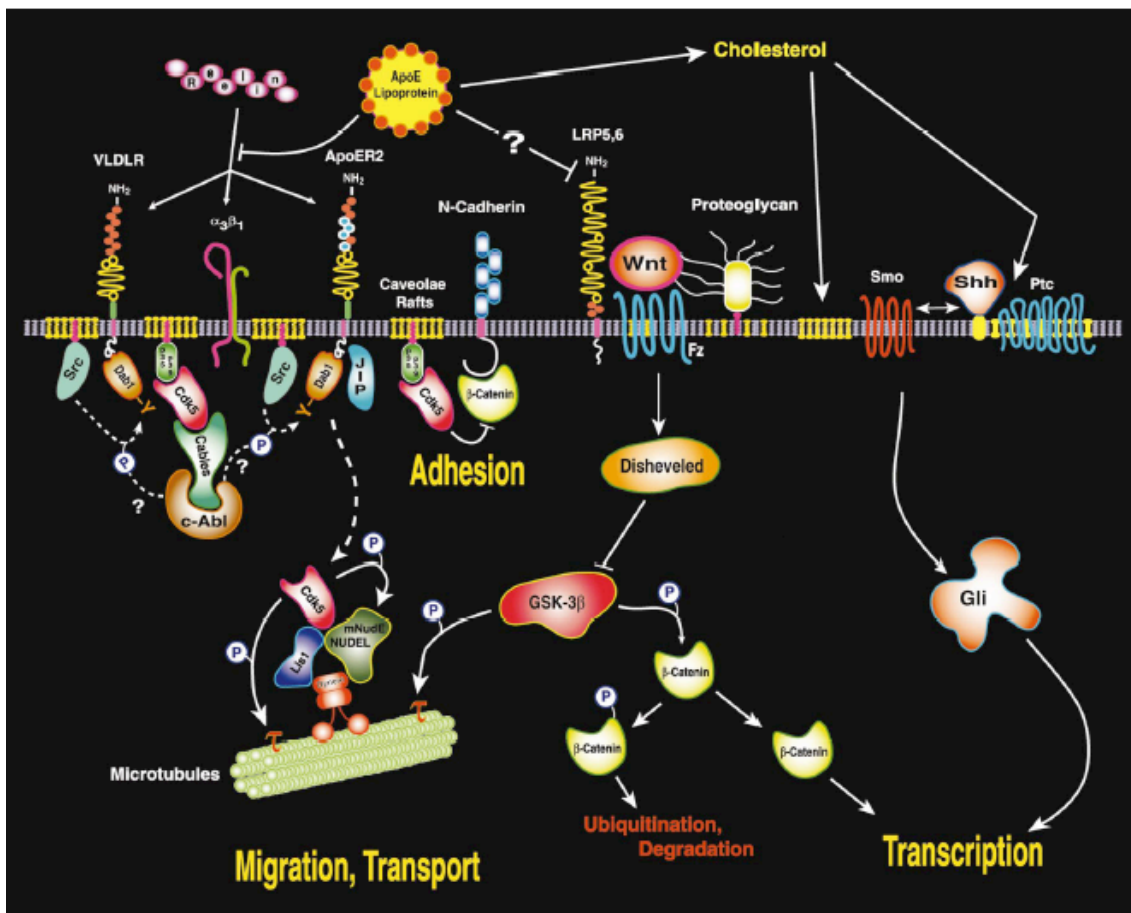
LR11 遺伝子欠損マウスは、正常に誕生し、生殖能力に異常はない。このマウスの血漿中のコレステロール値は正常であるが、中性脂肪値は同腹児よりも高く、高中性脂肪血症の表現型を引き起こす (Zhu et al., 2006)。また、このマウスは、アルツハイマー病における初期段階の脳の病変である老人斑の主成分である β アミロイド の産生が同腹児よりも高い(Andersen et al., 2005)。

以上の通り LDL 受容体遺伝子ファミリー欠損マウスは、リポタンパク代謝の異常から骨形成・中枢神経系形成まで様々な表現型を示した。またこれらマウスは、動脈硬化や糖尿病、アルツハイマー病などの種々の成人病と病態生理学的にリンクしており、モデルマウスとしての可能性を有している。そこで本研究では、LRP1B の生体での機能を解析することを目的とし、LRP1B 遺伝子欠損マウスの作製を行った。



LDL受容体ファミリー

Herz et al., 2002



LDL受容体ファミリーのコレステロール代謝とシグナル伝達

Herz, 2000

材料と方法

プラスミド作製

オリゴヌクレオチド

P19 F; 5'- AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG-3'

P19 R; 5'- GATCCTCGGTGA-3'

RT-PCR1F; 5'- GACTGTGACAGTTTCTTGTG -3'

RT-PCR1R; 5'- ATCCACACTGGTGCAGCTTT -3'

RT-PCR2F; 5'- GCGGATCCATGCTTTGCACAGTAAATAATGGAGGATG -3'

RT-PCR2R; 5'- AACCCAAAAGCTTGGAGATGC -3'

RT-PCR b-actinF; 5'-GTGACGAGGCCAGAGCAAGAG -3'

RT-PCR b-actinR; 5'-AGGGGCCGGACTCATCGTACTC -3'

LRP1B N F; 5'- CCAATTGTTCTGCTGAGTCACTAATTTTGC-3'

LRP1B N R; 5'- CCAATTGTGATCTTCCCGGTGAGCCTG-3'

LRP1B M F; 5'- CGGAATTCCACACCTGTGAGAACAATGGG-3'

LRP1B M R; 5'- CGCGTCTGACTGAGTAGTATAGTAGCTGAACC-3'

LRP1B C F; 5'- CCGGATCCGGTCATGGCTCAGTAGAGGT-3'

LRP1B C R; 5'- CCGAATTCCAAGAGTCTTCGCAGACTGC-3'

LRP1 N F; 5'- CCGGATCCAATGTGACTACGACAACGAC-3'

LRP1 N R; 5'- CCGTCGACATAGACAGCGCTGGTTTCG-3'

LRP1 C F; 5'- CCGGATCCGCTGGCTGTGGACTATCACA-3'

LRP1 C R; 5'- CCGAATTCCCTCACACTTATCGCCTGTGT-3'

LRP1B WT UP; 5'- TCTCTCTGCCCTCTTGCGTGATGT -3'

LRP1B WT LOW; 5'- AAGCCACAGCCAAGTCCAAATGTTC -3'

EGFP UP; 5'- CGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCG -3'

EGFP LOW 5'- CCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTC -3'

YTH F, 5'-CCGAATTCTGTGTAAGAGAAAAAGAAGAAC-3';

YTH R, 5'-GCGGATCCTTTATACAGCATAGAAAAGTGTCCCTTC-3';

YTH Δ R, 5'-GCGGATCCTATTCTCTGATGCCAATTTCTAT-3';

YTH NPxY1-mut F,

5'-GGGCCGCGGGGAGGTAATATGTATGAAGTGGACCACGAC-3';

YTH NPxY1-mut R,

5'-GGGGAGCTCCACCGCGGCGCCGATTTCTACATTTATTCCTCC-3';

YTH NPxY2-mut F,
 5'-CGCTGCAGGAGGGGCAAAATTATATATGGATGGACAG-3';
 YTH NPxY2-mut R,
 5'-CTCCTGCAGCGGAGTAATTTGTTGGCCCAGAAG-3';
 ex89 R, 5'-GCGGATCCTCATTACTTTACTGGATCTATCATGAAACT-3'
 ex90 F, 5'-CCGAATTCTCCAGGTACATAGGGGGAGGGTCC-3'
 ex90 R, 5'-GCGGATCCTCATTACCCAGAAGTTAGTGGTCCTTT-3'
 ex91 F, 5'-CCGAATTCCCAACAAATTACTCCAACCCAG-3'
 YTH LRP1 F, 5'-CGGAATTCGTCCGAGGGGCTAAGGGCTT-3';
 YTH LRP1 R, 5'-CCGGATCCGAAAGACTCATGTGGCAGGG-3';
 YTH LRP1 Δ R, 5'-CCGGATCCCTAATCTCCTATCTCGTCTTCAGG-3';
 JIP-1b F, 5'-CGCGAATTCAGCCCCGGCCTCCCACCTG-3';
 JIP-1b R, 5'-CGCCTCGAGCTACTCCAAGTAGATATCTTCTG-3';
 JIP-1b PTB F, 5'-CGCGAATTCTAAGCGACTGGATTGACCAGTTC-3';
 JIP-1b ΔPTB R, 5'-CGCCTCGAGCTAGTCGCTGTTTTTGGCAAGGG-3';
 PICK1 K27E F, 5'-GGTCACCCTACAGGAGGATGCCCAGAAC-3';
 PICK1 K27E R, 5'-GTTCTGGGCATCCTCCTGTAGGGTGACC-3';
 PICK1 KD27,28AA F, 5'-CACCTACAGGCAGCAGCCCAGAACCTG-3';
 PICK1 KD27,28AA R, 5'-CAGGTTCTGGGCTGCTGCCTGTAGGGTG-3';
 mini1 F, 5'-GCGATATCCTTTGCACAGTAAATAATGGAGGATG-3';
 mini1 R, 5'-AACCCAAAGCTTGGAGATGC-3';
 mini2 F, 5'-GCATCTCCAAGCTTTGGGTT-3';
 mini2 R, 5'-GCACAGGAATTCATCATCTC-3';
 mini3 F, 5'-CCCGAGATGATGAATTCCTGTGC-3';
 mini3 R, 5'-CCCTGATCTTCGGATCCTTTTGC-3';
 mini4 F, 5'-GCAAAAGGATCCGAAGATCA-3';
 mini4 R, 5'-TTTTTGTACTAGTACCCTCCTCAG-3';
 mini5 F, 5'-CTGAGGAGGGTACTAGTACAAAAA-3';
 mini5 R, 5'-GAATCATCTAGAAGACTGTCATC-3';
 mini6 F, 5'-GATGACAGTCTTCTAGATGATTC-3';
 mini6 R, 5'-TGAAACTTGGCTCGAGAAGACCCCA-3';
 mini7 F, 5'-TGGGGTCTTCTCGAGCCAAGTTTCA-3';
 mini7 R, 5'-CCCGCGGCCGCTTTATACAGCATAGAAAAGTGTCCTTC-3'.

JIP1b N F, 5'-GCGGATCCAGATGGCGGAGCGAGAGAGCGG-3'
JIP1b N R, 5'-CCGGATCCTGGTTGGACTCC-3'
PICK1 F, 5'-CTGTCTAGAGCACAGGCAACTATGAGT-3';
PICK1 R, 5'-TATGGATCCGGAGTCACACCAGCTTCC-3';
Antibody F, 5'-CGGAATTCCACACCTGTGAGAACAATGGG-3';
Antibody R, 5'-CGCGTCGACTGAGTAGTATAGTAGCTGAACC-3';
MPICK1 N F, 5'-GCGGGATCCATGTTTGCAGACTTAGACTA-3';
MPICK1 N R, 5'-CTTTGCGCATCTGGGAGAAG-3';
MPICK1 C F, 5'-ATACCGAGTGAGCACAGGCAAC-3';
MPICK1 C R,
5'-GGGAGCTCGCAAGCTTTCAGGAGTCACACCAGCTTCCGCCCTTGTC-3';

プラスミド

in situ ハイブリダイゼーションのための LRP1B のプローブは、LRP1B cDNA の 1-780bp (LRP1B N)、12189-12780bp (LRP1B M)、13212-13660bp (LRP1B C) を認識する 3 種類を作製した。また LRP1 のプローブは、LRP1 cDNA の 11105-11710 (LRP1 N)、12591-13140 (LRP1 C) を認識する 2 種類を作製した。マウス成体の全脳由来の cDNA から LRP1B N F / LRP1B N R (LRP1B N), LRP1B M F / LRP1B M R (LRP1B M), LRP1B C F / LRP1B C R (LRP1B C), LRP1 N F / LRP1 N R (LRP1 N), LRP1 C F / LRP1 C R (LRP1 C) のプライマーペアを用いて PCR を行った。それらの PCR 断片を pBluescriptII KS+ (Stratagene) にサブクローニングし、塩基配列を確認した。

pGBT9-LRP1BICD ex89-91 (LRP1B 4467-4599) と pGBT9-LRP1BICD ex89,91 の作製のために、YTH F / YTH R を用いて、mouse cDNA library から LRP1B の断片を増幅した。このプライマーセットでは、full-length の LRP1BICD (exon89-91) と、exon90 を欠失しているスプライシングフォーム(exon89,91)の2つの LRP1B の PCR 断片が増幅され、これらの断片をそれぞれ pGBT9(Clontech)の EcoRI/ BamHI サイトに組み込んで作製した。pGBT9-LRP1BICD ex89 (LRP1B 4467-4520), pGBT9-LRP1BICD ex90 (LRP1B 4521-4553), pGBT9-LRP1BICD ex91 (LRP1B 4554-4599), pGBT9-LRP1BICD ex89,90 (LRP1B 4467-4553), pGBT9-LRP1BICD ex90,91 (LRP1B 4521-4599) の作製のために、YTH F / ex89 R, ex90 F / ex90R, ex91 F / YTH R, YTH F / ex90 R, ex90 F / YTH R のプライマーセットを用いて、mouse

cDNA library から LRP1B の断片を増幅した。これらの断片をそれぞれ pGBT9 の EcoRI/ BamHI サイトに組み込んで作製した。pGBT9-LRP1BICDΔ3aa (LRP1B 4467-4596)の作製のために YTH F/ YTH Δ R を、pGBT9-LRP1BICD NPxY1-mut の作製のために YTH F/ YTH NPxY1-mut R, YTH NPxY1-mut F/ YTH R を、pGBT9-LRP1BICD NPxY2-mut の作製のために YTH F/ YTH NPxY2-mut R, YTH NPxY2-mut F/ YTH R を、pGBT9-LRP1BICD NPxY1,2-mut の作製のために YTH F/ YTH NPxY1-mut R, YTH NPxY1-mut F/ YTH NPxY2-mut R, YTH NPxY2-mut F/ YTH R を用いて、PCR で増幅した断片をそれぞれ pGBT9 の EcoRI/ BamHI サイトに組み込んで作製した。pGBT9-LRP1ICD (LRP1 4446-4545) と pGBT9-LRP1ICDΔ3aa (LRP1 4446-4542)の作製のために、YTH LRP1 F/ YTH LRP1 R と YTH LRP1 F/ YTH LRP1 Δ R のプライマーセットを用いて増幅した断片を、それぞれ pGBT9 に組み込んで作製した。

pACT2-JIP1 作製のために、JIP1b F/ JIP1b R を用いて、pcDNA3-T7-JIP1 からマウス JIP1 断片を増幅し、その断片を pACT2(Clontech) EcoRI/ XhoI に組み込んで作製した。pACT2-JIP1b PTB 作製のために JIP1b PTB F/ JIP1b R を、pACT2-JIP1b ΔPTB 作製のために JIP1b F/ JIP1b ΔPTB R を用いて、pcDNA3-T7-JIP1b からマウス JIP1b 断片を増幅し、これらの断片を pACT2 EcoRI/ XhoI それぞれ組み込んで作製した。

pACT2-PICK1 K27E 作製のために PICK1 K27E F/ PICK1 K27E R を、pACT2-PICK1 KD 27,28 AA 作製のために PICK1 KD27,28AA F/ PICK1 KD27,28AA R を用いて、pME18s-PICK1-myc から QuikChange Site- Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE)を用いて増幅させた。その後、メチル化 4 塩基認識の制限酵素である DpnI で処理し、PCR 産物だけを形質転換し、増幅した。その増幅したプラスミドを EcoRI/ ApaI 処理し、yeast two-hybrid スクリーニングにより同定したクローンの EcoRI/ ApaI に組み込んで作製した。

pCAGGS(SF)-FLAG-mLRP1B4 の作製のために、mini1 F/ mini1 R, mini2 F/ mini2 R, mini3 F/ mini3 R, mini4 F/ mini4 R, mini5 F/ mini5 R, mini6 F/ mini6 R, mini7 F/ mini7 R のプライマーの組み合わせを用いて、mouse adult brain Matchmaker cDNA library (Clontech)からマウス LRP1B の断片を増幅した。増幅した LRP1B の断片を、適当なプラスミドにサブクローニングし、シーケンスにより確認した後、クローニングサイトの前にシグナル配列・切断配列・1×FLAG epitope peptide を含む pCAGGS(SF)-FLAG の EcoRV/NotI サイトに移し替えた。結果

FLAG-mLRP1B4 は、4 番目のリガンド結合配列・1 回膜貫通ドメイン・細胞内領域を持つ、マウス LRP1B の 3276-4599 を認識する。

pcDNA3-myc-JIP1b 作製のために、JIP1b N F/ JIP1b N R を用いて、mouse cDNA library から JIP1b のアミノ末端側断片を増幅した。この JIP1b のアミノ末端側断片と pcDNA3-T7-JIP1b の BamHI/ XbaI 切断によるカルボキシ末端側断片とを pcDNA3-myc に組み込んで作製した。

pET32a-LRP1Bantigen (LRP1B 3296-3999)作製のために、Antibody F/ Antibody R を用いて、mouse cDNA library から LRP1B の断片を増幅した。増幅した LRP1B の断片を、pET32a(Novagen)の EcoRI/ SalI サイトに組み込んで作製した。

ヒスチジンタグ融合タンパクの作製のために、各種 yeast two-hybrid 用のコンストラクトから pET28a(Novagen)に移し替えて使用した。

pME18s-PICK1-myc 作製のために、まず PICK1 F/ PICK1 R を用いて、yeast two-hybrid screening により同定したクローンからマウス PICK1 C 末端断片を増幅した。この PCR 断片は、PICK1 cDNA の停止コドンを BamHI サイトに置換される。この PICK1 C 末端 PCR 断片と、yeast two-hybrid screening により同定したクローンを EcoRI/ XhoI 処理した PICK1 N 末端をともに、C 末端側に 3×myc peptide tags と停止コドンを付加した pME18s に組み込んで作製した。

pMAL-cRI-PICK1 作製のために、MPICK1 N F / MPICK1 N R と MPICK1 C F / MPICK1 C R を用いて、pME18s-PICK1-myc から増幅した断片をともに、pMAL-cRI(BioLabs)に組み込んで作製した。

pcDNA3-HA-mLRP4, pcDNA3-T7-JIP1, pcDNA3-T7-JIP1b, pcDNA3-His•S-JNK1 は、Dr. Guojun Bu と Dr. Roger Davis と善岡克次先生からそれぞれ譲り受けた。また、T7-RanBPM と FLAG-RanBPM 発現ベクターは、Dr. Yoshiaki Ishigatubo から譲り受けた。

抗体

LRP1B ポリクローナル抗体作製のために、大腸菌株 BL21(DE3)に、pET32a-LRP1B antigen (LRP1B 3296-3999)を形質転換した。BL21 タンパクの発現と精製については、大腸菌でのタンパク質発現と精製参照。精製した Thioredoxin (Trx)-His•S -LRP1Bantigen を PBS(-)に置換し、thrombin で切断した。そして Ni-NTA Agarose で再精製・再透析を行って得られた S -LRP1Bantigen を、ウサギに 4 週

間隔で3回免疫した後、血清を回収し、抗 LRP1B ラビットポリクローナル抗体とした。

JNK シグナル経路の活性の検討のために、JNK1 ポリクローナル抗体(SANTA CRUZ; sc-474)と Phospho-SAPK/JNK Antibody(Cell Signaling; #9251)を使用した。

また、ERK シグナル経路の活性の検討のために、p44/ p42 MAP Kinase Antibody (Cell Signaling; #9102) と Phospho- p44/ p42 MAP Kinase Antibody (Cell Signaling; #9101) を使用した。

免疫沈降やウエスタンブロットには、FLAG -M2 モノクローナル抗体(SIGMA)、抗 myc 抗体(9E10)、或いは T7-tag モノクローナル抗体(Novagen)、抗 HA 抗体(12CA5)を用いた。

In situ ハイブリダイゼーション

プローブの作製

LRP1B のプローブは、LRP1B cDNA の 1-780bp (LRP1B N)、12189-12780bp (LRP1B M)、13212-13660bp (LRP1B C)を認識する3種類を作製した。また LRP1 のプローブは、LRP1 cDNA の 11105-11710 (LRP1 N)、12591-13140 (LRP1 C)を認識する2種類を作製した。pBluescriptII KS+ (Stratagene)にサブクローニングした各断片を、それぞれを適当な制限酵素で切断後、Dig Nucleic Acid Detection kit (BOEHRINGER MANNHEIM)を用いて、T3 primer 或いは T7 primer でジゴキシゲン標識して増幅したものを antisense プローブ或いは sense プローブとした。

凍結切片の作製

成体マウス由来の脳を PBS (DEPC)で洗浄後、4°Cで一晩 4% Paraformaldehyde /PBS (DEPC)を用いて固定、続いて 4°Cで 30% sucrose/ PBS (DEPC)に置換した後、OCT -compound (サクラ精機)で包埋した。包埋した脳は、マイクロトームを用いて、20µm の冠状面の薄切切片にした。

ハイブリダイゼーション

作製した薄切切片は、室温で 30 分間 4% Paraformaldehyde /PBS (DEPC)で固定・37°Cで 10 分間 10µg/ml ProteonaseK /ProteinaseK buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0)・再固定・室温で 2 分間 0.1M TEA・室温で 10 分間 0.25%無

水酢酸/0.1M TEA ・室温で 10 分間 0.2M HCl / PBS (DEPC) ・室温で 1 時間 hybridization buffer (50% formamide, 5×SSC, 0.25% SDS, 200µg/ml tRNA, 1×Denhardt's, 5mM EDTA pH8.0)でプレハイブリダイゼーションなどの前処理を行った。200 倍希釈プローブ/ hybridization buffer を 85°Cで 3 分間鋳型 RNA の変性を行った後、前処理した薄切切片上に載せ、55°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後薄切切片を、5×SSC ・TNE (10mM Tris-HCl pH8.0, 500mM NaCl, 1mM EDTA pH8.0)などでプローブ洗浄し、室温で 20 分間 0.5% blocking buffer (0.5% blocking reagent (Roche) /PBS)でブロッキングした。さらにブロッキングした薄切切片を、4°Cで一晩 500 倍希釈 Anti -Digoxigenin -AP Fab fragment (Roche) and 0.5% BSA /PBS で反応させた後、TBS とアルカリフォスファターゼバッファー(100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH9.5, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween20)で洗浄し、NBT /BCIP 溶液(75mg/ml NBT, 25mg/ml BCIP /アルカリフォスファターゼバッファー)を用いて室温で発色させた。その後、TBS で発色を停止させ、定法に従い封入した。

LRP1B 遺伝子欠損マウスの作製

LRP1B ゲノム DNA の単離

マウス 129SV ゲノムライブラリーより、エクソン 1 の一部(nt. 1-780)をプローブとしたプライクハイブリダイゼーション法により単離した。

ES 細胞培養

129SV/Jae マウス由来の ES 細胞である RF8 細胞は、15% FBS, 0.1mM 非必須アミノ酸, 0.11mM 2-メルカプトエタノールを含む DMEM 中で培養した。また、ES 細胞の未分化維持に働くフィーダー細胞として、STO 細胞にネオマイシン耐性遺伝子と白血病阻害因子の発現ベクターを組み込んだ SNL 細胞を使用した。

LRP1B 導入 ES 細胞のセレクション

RF8 細胞へのターゲティングベクターの導入はエレクトロポレーション法により行った。エレクトロポレーション後、翌々日から 250µg/ml G418 (GENETICIN SOLUTION [SIGMA])を含むメEDIUMで G418 耐性の細胞の、5 日-7 日後に 0.2µM FIAU (2' -Deoxy -2'-fluoro -b-D-arabionofuranosyl -5'-iodouracil

[Moravek Biochemicals]) を含むメEDIUMでチミジンキナーゼ遺伝子を含まない細胞の選択を行った。13 日後に ES 細胞のコロニーを 24 well plate へ移し、コンフルエントになるまで培養した。一部を凍結保存し、残りをゲノム抽出用にゲラチンコートしたプレートに播き、オーバーコンフルエントになるまで培養した後、ゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を用いて、サザンハイブリダイゼーションによるターゲティングベクター導入の確認を行った。

ES 細胞からのゲノム DNA 抽出

ES 細胞を PBS で洗浄後、Lysis buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl, 25mM EDTA pH8.0, 0.4% SDS) 500 μ l を加え、37°Cで 15 分間インキュベーションした。チューブに移し、200 μ g/ml になるよう Proteinase K を加え、55°Cで一晩震盪した。20 μ g/ml になるよう RNaseA を加え、37°Cで一時間反応させた後、精製し、10mM Tris-HCl pH8.0 100 μ l を加えてゲノム DNA を溶解した。

サザンハイブリダイゼーション

ES 細胞から抽出したゲノム DNA 10 μ g を *Bam*HI で消化後、サイズマーカーと共に 0.8%アガロースゲル/ TAE buffer (40mM Tris, 40mM CH₃COOH, 1mM EDTA pH8.0)で電気泳動した。DNA を変性させるために、ゲルの 5 倍量の Denaturing buffer (0.5N NaOH /1.5M NaCl)で 15 分間震盪した後、ゲルを軽く洗浄した。次に中和させるために Neutralizing buffer (1M NH₄Ac, 0.02M NaOH)をゲルの 5 倍量の溶液で 30 分間ずつ 2 回震盪した。Neutralizing buffer を用いてニトロセルロースメンブレン (PROTORAN [S&S]) にトランスファーし、UV cross linker (FUNA-UV-LINKER FS-1500 [フナコシ])によって DNA をメンブレンに固定した。メンブレンを 3 \times SSC で洗浄後、ハイブリダイゼーションバッファー(6 \times SSC, 10mM EDTA pH8.0, 1% SDS, 5 \times Denhart's solution, 10 μ g/ml denatured salmon sperm DNA)を加え 65°Cで 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った後、³²Pラベルしたプローブ(nt. -3185- -2521)を加え、65°Cで 16-24 時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを 0.1 \times SSC /0.1% SDS で洗浄した後、X 線フィルムに-80°Cで一晩感光し、自動現像機で現像した。

マウス尾からのゲノム DNA 抽出

マウス尾を 1cm 程切断し、600 μ l Tail buffer (50mM Tris-HCl pH7.6, 100mM NaCl,

100mM EDTA pH8.0, 1% SDS)と 167 µg/ml になるよう Proteinase K を加え、55°C で一晩震盪しながら溶解後、精製し、TE 100µl を加えてゲノム DNA を溶かした。これを 100 倍に希釈したものから LRP1B WT UP / LRP1B WT LOW, EGFP UP / EGFP LOW のプライマーペアを用いて PCR を行った。

Total RNA 抽出

マウス成体の全脳を凍結・破砕した後、セパゾール RNA I Super (ナカライテスク)を用いて total RNA を抽出した。

RT-PCR

total RNA を DNaseI で処理後精製し、65°C で 10 分間鋳型 RNA の変性を行った。調整した total RNA を First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス)に付属している pd(N)₆Primer を用いて cDNA を合成した。LRP1B の遺伝子発現を確認するために、この cDNA から RT-PCR1F / RT-PCR1R, RT-PCR2F / RT-PCR2R の 2 つのプライマーペアを用いて PCR を行った。この際、ハウスキーピング遺伝子 β -actin の遺伝子発現の確認を RT-PCR β -actinF / RT-PCR β -actinR のプライマーペアを用いて同時に行った。

Yeast two-hybrid システム

Yeast two-hybrid スクリーニング

酵母株 HF7c と CG1945 に bait plasmid (pGBT9-LRP1BICD) を形質転換した。これらの酵母株を 12.5ml SD(-Trp) 培地を用いて 30°C で一晩震盪培養した後、50ml YPAD 培地に移しさらに 4-5 時間震盪培養した。菌体を回収し、DDW, LiOAc でそれぞれ一回洗浄後、10µg の Mouse Brain Matchmaker cDNA Library (Clontech) を形質転換した。これを 15cm の SD (-Trp, -Leu, -His) プレート 10 枚に播いた。約 7 日後、コロニーをピックアップし、新たな SD プレート上でシングル化を行った。各クローンから 3 つずつコロニーを拾い、フィルターアッセイにより、 β -ガラクトシダーゼアッセイを行った。ポジティブクローンからプラスミドを抽出し、再度酵母株 SFY526 を用いて β -ガラクトシダーゼアッセイを行い、ポジティブクローンに関してシークエンスを行った。

Yeast two-hybrid 結合アッセイ

酵母株 HF7c に、bait (pGBT-) および prey (pGAD424-) プラスミドを同時に形質転換し、SD (-Trp, -Leu) プレートで選択した。各クローンをシングル化した後、それぞれのクローンから 3 つずつコロニーを拾い、0, 2.5, 5, 10, 20mM 3-AT (3-amino- 1,2,4- triazole)を含む SD (-Trp, -Leu, -His) プレートに播いた。

また、酵母株 SFY526 に、bait (pGBT-) および prey (pGAD424-) プラスミドを同時に形質転換し、SD (-Trp, -Leu) プレートで選択した。各クローンをシングル化した後、それぞれのクローンから 3 つずつコロニーを拾い、液体培地で培養し、 β -ガラクトシダーゼ活性 (Millar Unit) を測定した。その結果、結合の見られたものを+++、++、+、見られないものは-で示した。

細胞培養

P19 細胞は、25mM NaHCO₃, 2.5% FBS, 7.5% CS を含む α -MEM 中で培養した。また HEK293T 細胞、COS7 細胞、N1E115 細胞は、10% FBS を含む DMEM 中で培養した。

P19 細胞の神経分化過程において発現上昇する遺伝子の単離

P19 細胞の神経分化を誘導するために、1 μ M レチノイン酸含有の培養液を用い、非接着性プレート上で 48 時間培養した後、細胞を集合させ、レチノイン酸非含有の培養液を用い、非接着性のプレート上で 48 時間培養した。神経分化前後の P19 細胞から ISOGEN (Wako)を用いて total RNA を抽出した。神経分化前後の P19 細胞由来の total RNA を DNaseI で処理後精製し、65°Cで 10 分間鋳型 RNA の変性を行った。調整した total RNA を First-Strand cDNA Synthesis Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)に付属している pd(N)₆Primer を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を MboI で消化した試料を鋳型として、P19 F /P19R のプライマーペアを用いて PCR を行い、これらの PCR 産物を RDA の tester と driver として用いた。RDA を 3 回行った後、driver のみに存在した PCR 断片を pBluescriptII KS+ (Stratagene)にサブクローニングし、塩基配列の決定と NCBI GeneBank database で検索を行った。(詳細な RDA 法のための cDNA 調整と RDA 法に関しては、四方孔および松本久美 平成 7 年度修士論文参照)

免疫沈降法

HEK293T 細胞を 10cm dish に 1.7×10^6 cells 播き、24 時間後、 $3\mu\text{g}$ の各プラスミドをリン酸カルシウム法により形質転換を行った。形質転換の 16 時間後にメディアウム交換、48-72 時間後に $500\mu\text{l}$ の lysis buffer A[25mM Tris-HCl pH7.6, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 50mM NaF, 1% TritonX100 and protease inhibitor cocktail ($2\mu\text{g/ml}$ leupeptin, $2\mu\text{g/ml}$ pepstain, 2mM Benzamide Hydrochloride Monohydrate, $40\mu\text{g/ml}$ bestatin hydrochloride, 1mM PMSF)]或いは lysis buffer B [20mM Tris-HCl pH7.6, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0.5mM EDTA, 200mM sucrose, 50mM NaF, 0.5% TritonX100, and protease inhibitor cocktail]或いは lysis buffer C [23mM Tris-HCl pH7.6, 20mM KCl, 72mM NaCl, 3.5mM EDTA, 3.3mM EGTA, 67mM sucrose, 50mM NaF, 0.83% TritonX100 and protease inhibitor cocktail]を加えて、30 分間氷上、超音波処理により、タンパクを抽出した。不溶性画分を 4°C , 15000rpm で 30 分間の遠心によって除いた後、得られた可溶性画分を cell lysate として用いた。得られた Cell lysate に、proteinG-Sepharose beads (Qiagen)に結合させた FLAG -M2 モノクローナル抗体(SIGMA)、抗 myc 抗体(9E10)、或いは T7-tag モノクローナル抗体(Novagen)を加え、 4°C で 2 時間ローテーションした。一部は発現を確認するために、直接ウエスタンブロットに使用した。Beads を TBST [50mM Tris-HCl pH7.6, 100mM NaCl, 0.05% Tween20]で 3 回洗浄した後、等量の $2 \times \text{SDS}$ サンプルバッファーを加えた。6%もしくは 8%のアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、抗 FLAG 抗体、抗 myc 抗体、抗 HA 抗体(12CA5)、或いは抗 T7 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

免疫蛍光染色

N1E115 細胞を 24 ウェルプレートに播き、7-8 割コンフルエントになった時点で、 $0.5\mu\text{g}$ の各プラスミドを PEI 法により形質転換を行った。形質転換の 24 時間後に、リシン処理を施したカバーガラス上に、形質転換した N1E115 細胞を 3 等分に播き直した。更に 24 時間後、細胞を PBS で洗浄し、4% PFA/ PBS を用い、室温で 20 分間固定した。0.2% Triton X-100/ PBS で処理した後、1:100- 1:1000 希釈の一次抗体および二次抗体で染色を行った。封入剤で封入した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ビオチン化による内在化のアッセイ

HEK293T 細胞を 6cm dish に 6.12×10^5 cells 播き、24 時間後、total 3 μ g のプラスミドをリン酸カルシウム法により形質転換を行った。形質転換の 24 時間後にメディアウム交換、48 時間後にアッセイを行った。細胞を PBS で 2 回洗浄し、細胞膜非透過性の biotin reagent (0.5mg/ml EZ-Link Sulfo-SS-Biotin (PIERCE) in PBS) を 2ml 加え、氷上で 15 分間おき、膜上タンパクに biotin を付加させた。細胞を PBS で洗浄し、必要に応じて 1 μ M TPA (Phorbol -12- myristate -13- acetate/ 12-Tetradecanoyl) を加え、37°C で 15 分間おいた後、細胞を回収した。細胞を Strip buffer (50mM glutathione, 75mM NaCl, 75mM NaOH) で 2 回、PBS で 2 回洗浄した後、1% TritonX-100 in PBS を加えて、30 分間氷上、ホモジナイズし、不溶性画分を 4°C, 15000rpm で 30 分間の遠心によって除いた後、得られた可溶性画分を cell lysate として用いた。得られた Cell lysate に、30 μ l avidin agarose (VCTOR LABORATORIES) を加え、4°C で 3 時間ローテーションした。agarose を 1% TritonX-100 in PBS で 5 回洗浄した後、等量の 2 \times SDS サンプルバッファーを加えた。6% のアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、抗 FLAG 抗体或いは抗 HA を用いてウエスタンブロットを行った。

RanBPM の ERK 或いは JNK シグナル伝達経路への関与を検討するためのレポーターアッセイ

COS7 細胞を 12 ウェルプレートに 4.0×10^4 cells を播き、18 時間後に以下に記した量のプラスミドをリン酸カルシウム法により形質転換を行った。レポーターアッセイには、0-2000ng の T7-RanBPM 発現プラスミドと 400ng のレポータープラスミド(pSRE-Luc)(Clontech)と必要に応じて 0-1600ng の FLAG-mLRP1B4 または mLRP4 を用いた。形質転換効率を調べるためのコントロールとして、同時に 167ng のプラスミド(pME18s-LacZ)を形質転換した。

HEK293T 細胞を 12 ウェルプレートに 2.0×10^5 cells を播き、18 時間後に以下に記した量のプラスミドをリン酸カルシウム法により形質転換を行った。レポーターアッセイには、0-300ng の T7-RanBPM 発現プラスミドと 100ng のレポータープラスミド(pSRE-Luc)と必要に応じて 0-300ng の FLAG-mLRP1B4 または mLRP4 を用いた。形質転換効率を調べるためのコントロールとして、同時に 20ng のプラスミド(pCMV-LacZ)を形質転換した。

形質転換の 12 時間後にメディアウム交換、さらに 36 時間後に無血清状態に移行させ、その 12 時間後に細胞を PBS で 2 回洗浄し、ルシフェラーゼ活性と β -ガ

ラクトシダーゼ活性を測定した。

RanBPM の転写への関与を検討するためのレポーターアッセイ

HEK293T 細胞を 12 ウェルプレートに 2.0×10^5 cells 播き、18 時間後に以下に記した量のプラスミドをリン酸カルシウム法により形質転換を行った。レポーターアッセイには、0-200ng の GAL4 融合タンパク発現プラスミドと 100ng のレポータープラスミド(pGL3-G5-TK または pGL3-TK)(Promega)と必要に応じて 0-200ng の T7-RanBPM を用いた。形質転換効率を調べるためのコントロールとして、同時に 20ng のプラスミド(pCMV-LacZ)を形質転換した。形質転換の 12 時間後にメディウム交換、さらに 48 時間後に細胞を PBS で 2 回洗浄し、ルシフェラーゼ活性と β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

大腸菌でのタンパク質発現と精製

大腸菌株 BL21(DE3)に各種 pET28 プラスミド或いは各種 pMAL-cRI プラスミドを形質転換した。2%グルコースを含む LB 培地 40ml を用いて大腸菌を 37°C で一晩培養した後、400ml の培養液に移し、さらに 37°C で $OD_{600}=0.5$ になるまで培養した。そこに、0.1mM になるように IPTG を加え、37°C で 3 時間培養した。

ヒスチジntag融合タンパクは、遠心により菌を回収し、PBS(-)で洗浄した後、ヒスチジntag用バッファー[100mM リン酸バッファーpH7.8, 300mM NaCl] に懸濁し、超音波処理をした。遠心により破砕物を除いた後、Ni-NTA Agarose (Qiagen) を加え、4°C で 3 時間ローテーションした。その後、ヒスチジntag用バッファーで数回洗浄し、250mM イミダゾールを含むヒスチジntag用バッファーを用いてヒスチジntag融合タンパクを溶出した。一方、マルトース結合タンパク融合タンパクは、遠心により菌を回収し、PBS(-)で洗浄した後、マルトース結合タンパク用バッファー[20mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.2% TritonX]に懸濁し、超音波処理をした。遠心により破砕物を除いた後、AMYLOSE RESIN (NEW ENGLAND BioLabs)を加え、4°C で 24 時間ローテーションした。その後、マルトース結合タンパク用バッファーで数回洗浄し、10mM マルトースを含むマルトース結合タンパク用バッファーを用いてマルトース結合タンパクを溶出した。

In vitro kinase assay

In vitro kinase assay のために、上記で精製した His-LRP1BICD, His-LRP1ICD, His-LRP1BICD Δ 3aa, His-LRP1ICD Δ 3aa, MBP, MBP-PICK1 を透析バッファー [20mM Hepes pH7.4, 120mM NaCl, 1mM CaCl₂]に置換した。

各種融合タンパクのリン酸化確認のために、精製したタンパクをそれぞれ 100pmol/10 μ l になるよう調整し、10 μ l リン酸化バッファー [40mM Tris-HCl pH7.5, 20mM MgCl₂, 200 μ g/ml L- α -phosphatidyl-L-serine, 40 μ g/ml 1,2-dioleoyl-sn-glycerol, 2mM γ -³²P-ATP, 40ng recombinant PKC α (MERCK)] を加え、30°C で 10 分間反応した。その後、SDS サンプルバッファーを加え、100°C で 5 分間加熱することにより、反応をストップさせ、SDS-PAGE を行った。

また、PICK1 のリン酸化への影響確認のために、記載した分量の His-LRP1BICD, His-LRP1ICD, His-LRP1BICD Δ 3aa 或いは His-LRP1ICD Δ 3aa と MBP 或いは MBP-PICK1 とを 10 μ l になるよう調整し、4°C で 3 時間ローテーションした。その後、10 μ l リン酸化バッファーを加え、30°C で 3, 10, 30 分間反応した。その後同様に、SDS サンプルバッファーを加え、100°C で 5 分間加熱することにより、反応をストップさせ、SDS-PAGE を行った。

結果

1. LRP1B 遺伝子の単離

1-1. P19 細胞の神経分化過程において、LRP1B 遺伝子の発現は上昇する

P19 細胞のレチノイン酸添加と凝集による神経分化は、哺乳類の中樞神経系発生と類似している。本研究室では、神経分化に関連する遺伝子の同定のために、マウス胚性ガン細胞株である P19 細胞を用いた RDA 法を行った。その結果、神経分化誘導後に発現の上昇する 51 の遺伝子断片を単離した。これらの遺伝子断片を、NCBI GeneBank database でホモロジー検索を行ったところ、51 のうち 19 の遺伝子断片が、機能未知の遺伝子由来の断片であった。そして 19 のうち 3 の遺伝子断片が、新規の遺伝子由来の断片であり、その 1 つが LRP1B 遺伝子であった。

LRP1B 遺伝子の発現が、実際に P19 細胞の神経分化に従い上昇するのかを確認するために、RT-PCR 法を行った。その結果、LRP1B 遺伝子は、P19 細胞のレチノイン酸添加と凝集前には発現していないが、レチノイン酸添加 4 日目以降から発現上昇が見られ、それ以降も強く発現していた(図 1)。以上から LRP1B 遺伝子は、神経分化に関与する遺伝子として同定した。

2. LRP1B 遺伝子の発現解析

2-1. 成体マウスにおける LRP1B 遺伝子の発現部位

成体マウスの主要臓器由来の total RNA から cDNA を合成し、LRP1B; RT-PCR1F / RT-PCR1R 或いは β -actin; RT-PCR b-actinF / RT-PCR b-actinR のプライマーペアを用いて PCR 増幅し、発現解析をした。その結果、LRP1B 遺伝子は、脳で特異的に発現していた(図 2)。

2-2. 成体マウスの脳における LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の発現比較

LRP1B と LRP1 は、一次構造より予想されるタンパクの大きさ・構造上類似している。また、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子は共に、脳での発現が確認されている。そこで、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の脳における発現を詳細に解析するために、*in situ hybridization* 法を用いて mRNA レベルでの発現部位の比較をした。

in situ hybridization 法を行うために、ジゴキシゲニン標識した 3 種類の LRP1B のプローブと 2 種類の LRP1 のプローブを作製した。LRP1B に対するプローブには、(1)翻訳開始点までの LRP1B cDNA 1-780 部分を認識し、LRP1 と 46.2%の相同性を持つもの(LRP1B N)、(2)N 末端側から 4 番目のリガンド結合ドメインを構成する LRP1B cDNA 12189-12780 部分を認識し、LRP1 と 55.6%の相同性を持つもの(LRP1B M)、(3)細胞膜貫通ドメイン直前の EGF リピートを構成する LRP1B cDNA 13212-13660 部分を認識し、LRP1 と 52.4%の相同性を持つもの(LRP1B C)を使用した。また、LRP1 に対するプローブには、(1) N 末端側から 4 番目のリガンド結合ドメインを構成する LRP1 cDNA 11104-11692 部分を認識し、LRP1B と 67.1%の相同性を持つもの(LRP1 N)、(2) N 末端側から 4 番目のリガンド結合ドメイン直下の EGF 前駆体相同ドメインを構成する LRP1 cDNA 12591-13140 部分を認識し、LRP1B と 53.8%の相同性を持つもの(LRP1 C)を使用した。

マウスの脳の薄切切片を用いた *in situ* hybridization 法の結果を示した(図 3-5)。これまでに、終脳から小脳領域にかけての前頭面(冠状面)の切片を用いて *in situ* hybridization 法を行った。

終脳領域の切片を用いて、LRP1B と LRP1 の mRNA レベルでの発現の比較を行った。LRP1B と LRP1 の mRNA は共に、大脳皮質のニューロンに乏しい第 1 層を除いた、第 2 層から第 6 層にわたり幅広く発現していた(図 3)。また両 mRNA は、海馬の錐体細胞層などで強い発現が見られた(図 4)。終脳領域における LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の発現状況の違いは見れなかった。

小脳領域の切片を用いて、LRP1B と LRP1 の mRNA レベルでの発現の比較を行った。小脳皮質は解剖学的に分子層・プルキンエ細胞層・顆粒細胞層の 3 層に分類される。LRP1B と LRP1 の mRNA は、小脳皮質のいずれの層においても発現していた(図 5)。また *in situ* hybridization 法の結果を見る限り、小脳領域における LRP1B と LRP1 の mRNA の発現状況に違いは見られなかった。

in situ hybridization 法の結果のみでは、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の発現している細胞が、神経細胞特異的であるか、或いはグリア細胞においても発現しているかについて明確に出来なかった。

3. LRP1B 遺伝子欠失マウスの作製

生体内で、LRP1B がどのような機能を保持しているか知られていない。そこで、LRP1B の生体内での機能を調べることを目的として、LRP1B 遺伝子欠失マウスを作製した。

LRP1B 遺伝子欠失マウスを作製するために、遺伝子のどの領域を、またどのような方法により欠失させるかを検討した。これまでに LDL 受容体遺伝子ファミリーの遺伝子欠失マウスが作製されているが、特に決まった領域を欠失させているといった傾向は見られない。共通している点は、この受容体ファミリーは一回膜貫通型タンパクであるため、細胞膜貫通領域より N 末端側領域を欠失させる形で、タンパクの機能を欠失させていることである。

LRP1B は cDNA サイズ 15000bp、タンパクサイズ 600kDa にも及ぶ巨大な一回膜貫通型タンパクで、細胞膜に固着して受容体として機能している。LRP1B 遺伝子は 91 個ものエクソンからなり、1つ1つのエクソンが約 100-200bp と非常に短い。また、イントロンが非常に長く 500kbp 以上にも及ぶゲノム領域をコードしていると考えられている。これらの理由から本研究では、null 型ターゲティング法での、LRP1B 遺伝子欠失マウスの作製を行った。

LRP1B 遺伝子の翻訳開始コドンはエクソン 1 に存在する。このエクソン 1 は、LRP1B のエクソンの中でも長く 1000bp 強ある。エクソン 1 にある翻訳開始点直前までの 780bp をプローブとして、129SV ゲノム DNA ライブラリーからプラークハイブリダイゼーション法により、マウス LRP1B のエクソン 1 周辺のゲノム DNA 約 23kbp を単離した(図 6)。

相同組み換えが起こった細胞のポジティブセレクションのために、上流に PGK-1 (mouse phosphoglycerate kinase-1) プロモーター配列を、下流に PGK-1 polyA シグナル配列を持つネオマイシン耐性遺伝子を使用した。ネガティブセレクションのために、上流に PGK-1 プロモーター配列を、下流に PGK-1 polyA シグナル配列を持つチミジンキナーゼ遺伝子を使用した。また、LRP1B 遺伝子の発現部位の解析を可能にするために下流に BGH (bovine growth hormone) polyA シグナル配列を持つ EGFP (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子を組み込んだ。

具体的には、翻訳開始点・その下流の小胞体シグナル配列を含む 28aa・エクソン 1 のスプライシングドナー部位を除去するように、2つの EcoRI 断片 703bp を EGFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子で置き換えた。相同組み換え後は、mRNA レベルでは LRP1B 由来のプロモーターから転写が開始され、EGFP 遺伝

子の下流に組み込んだ BGH polyA シグナル配列で転写は終了する。タンパクレベルでは、LRP1B が本来発現する箇所に EGFP が発現し、翻訳開始点とシグナル配列が欠落するため、細胞膜上に機能を有する LRP1B は現れなくなると想定した。

ターゲティングベクターには、チミジンキナーゼ遺伝子を最アミノ末端に挿入し、ネオマイシン耐性遺伝子のアミノ末端側に約 2kbp、カルボキシル末端側に約 8.5kbp の LRP1B ゲノム DNA を組み込んだ(図 6)。

この様にして作製したターゲティングベクターを、エレクトロポレーション法により RF8 細胞に導入し、相同組み換えの生じた細胞株を G418 と FIAU を用いて選択した。

相同組み換え体の確認には、*Bam*HI で消化し、ショートアームの上流 650bp をプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、予想どおり野生型では 11kbp のシグナルが検出され、相同組み換え体では 11kbp と 7kbp にシグナルが検出された(図 6) (図 7A)。

相同組み換えの起きた ES 細胞が 1 クローン得られ、それを初期胚に移植し、代理母の子宮内に戻して発育させ、キメラマウスを得た。キメラマウス♂と C57BL /6J マウス♀を掛け合わせて誕生したヘテロマウス同士を掛け合わせるにより LRP1B 遺伝子欠失マウスを作製した。LRP1B 遺伝子欠失マウスの遺伝子型解析のために PCR による確認を行った(図 7B)。その結果、ヘテロマウス同士の掛け合わせにより誕生したマウスは、+/+ : +/- : -/- = 8 : 9 : 3 であった。

LRP1B 遺伝子欠失マウスは正常に誕生し、生殖能力に異常はなかった。

得られた LRP1B 遺伝子欠失マウスの脳から RNA を抽出して RT-PCR により発現の確認を行った。LRP1B 欠失マウスでは、LRP1B mRNA の発現が検出されなかったことから、このマウスでの LRP1B 遺伝子の発現は完全に抑制されていることが確認できた(図 7C)。

成体マウスの脳の形状などを観察したが、特に異常は見られなかった。また、約 3 年間マウスを飼育したが、目立った異常行動や異常増殖は観察されなかった。

4. LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの探索

LDL 受容体ファミリーに属する ApoER2 と VLDLR は、細胞外分泌タンパク

Reelin の受容体として機能し、下流の Disabled-1 にシグナルを伝達する(Herz and Chen, 2006)。同じく LDL 受容体ファミリーに属する LRP5 或いは LRP6 は、Frizzled と共同して細胞外分泌タンパク Wnt の受容体として機能し、効率的に β -カテニン経路を活性化する(小林泰浩と高橋直之, 2006)。また LRP1 は、細胞外からのシグナルを受け取る受容体として、PDGFR や Calreticulin の共働受容体として機能し、これら受容体の下流にシグナルを伝達していることが示唆されている(Boucher et al., 2003) (Lillis et al., 2008)。このように LDL 受容体ファミリーは、細胞外からのシグナルを細胞内に伝達することが知られている。また LRP1B 遺伝子は、ガン抑制遺伝子であり、腫瘍の異型度との関連も報告されている。これらのことから、LRP1B も他の LDL 受容体ファミリー同様にシグナル伝達経路に関与する可能性があると考え、LRP1B の細胞内ドメインに結合するタンパクを yeast two-hybrid スクリーニングを用いて探索した。

LRP1B の細胞内ドメイン全長(LRP1B 4467-4599) (図 8 LRP1B FL)を bait として、約 400 万クロンの mouse adult brain cDNA library をスクリーニングし、HIS 陽性、 β -ガラクトシダーゼ陽性の既知の 6 個の遺伝子を合計 25 クローン得た(表 1)。LRP1B の細胞内ドメインに結合する因子として最も多く同定された遺伝子は、JNK (c-Jun N-terminal kinase)シグナル伝達経路の足場タンパクとして知られている JIP-1b (JNK interacting protein -1b)で 12 クローンであった。JIP-1b のファミリー遺伝子である JIP-2 (JNK interacting protein -2)も 1 クローン同定した。そのほかに、海馬の神経細胞の spines において AMPA (α -amino -3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazole propionate acid receptor)型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスに関連している PICK1 (protein interacting with C kinase 1)を 6 クローン同定した。Ras の恒常活性や転写調節に関わる RanBPM (Ran-binding protein in the microtubule-organizing center)も 4 クローン同定した。細胞の移動に関与することが知られている Grb7 (growth factor receptor -bound protein 7)と、ジストロフィン複合体を形成している syntrophin ファミリーの 1 つであり、中枢神経系での機能がまだ知られていない SNTG2 (γ 2-syntrophin)をそれぞれ 1 クローンずつ同定した。今回のスクリーニングにより同定した LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの構造と、スクリーニングにより得られたクロンが認識するアミノ酸残基を示した(図 9)。

興味深いことに、JIP-1b と JIP-2 を除く 4 つのタンパクに関しては、他の LDL 受容体ファミリーとの結合が報告されていない。

5. LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクと LRP1 細胞内ドメイン或いは LRP1B 細胞内ドメイン選択的スプライシングにより生じたエクソン 89 と 91 から構成されるアイソフォームとの結合確認

LRP1B は、LDL 受容体ファミリーのなかでも LRP1 とアミノ酸レベルで 52% の相同性を持っており、その構造は酷似している。それぞれの細胞内部位の配列を比較しても、LRP1B において挿入部位があるが、2つの NPxY モチーフ・YXXL モチーフ・ジロイシンモチーフなどのエンドサトーシスに関わるモチーフやタンパク結合モチーフは、保存されている(図 10)。

JIP-2 の PTB ドメインは、ApoER2 と結合する。ApoER2 の細胞内ドメインには、PTB ドメインの典型的な結合配列である NPxY モチーフを保有しているにも関わらず、JIP-2 は、ApoER2 の prolin-rich 領域に結合している(Stockinger et al., 2000)。ApoER2 の細胞内ドメインは、エクソン 17 から 19 により構成されている。prolin-rich 領域を持つ ApoER2 のエクソン 18 は、選択的スプライシングが起きるため、完全長の ApoER2 のみが JIP-1 や JIP-2 と結合する(Kim et al., 1997) (Sun et al, 1999)。LRP1B の細胞内ドメインは、ApoER2 の細胞内ドメインと同様に、選択的スプライシングが起こることが知られている(Marschang et al., 2004)。LRP1B の細胞内ドメインは、エクソン 89 から 91 の 3つのエクソンから構成されており、選択的スプライシングにより、エクソン 89 から 91 の 3つのエクソンから構成されるアイソフォームとエクソン 89 と 91 の 2つのエクソンから構成されるアイソフォームを生じる。LRP1B のエクソン 89 と 91 から構成されるアイソフォームの細胞内ドメイン構造は、LRP1 の細胞内ドメイン構造と酷似する。尚、この LRP1B の選択的スプライシングによる影響は、報告されていない。

そこで 6つの LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの、LRP1 細胞内部位との結合、また、LRP1B 細胞内部位の選択的スプライシングによる結合への影響を検討するために、yeast two-hybrid 法のフィルターアッセイと β -ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)による lac Z 活性の定量化を行った。

その結果、JIP-1b, JIP-2, PICK1, RanBPM は、LRP1 の細胞内ドメインと結合したが、Grb7 と SNTG2 は、LRP1 の細胞内ドメインと結合しなかった(表 2)。

また、PICK1, RanBPM, Grb7 は、LRP1B のエクソン 89 と 91 から構成されるアイソフォームに結合するが、JIP-1b, JIP-2, SNTG2 は、LRP1B のエクソン 89 と 91 から構成されるアイソフォームに結合しなかった (表 2)。

6. JIP-1b

JIP-1b は、JNK と結合するタンパクとして、yeast two-hybrid スクリーニングにより同定された (Dickens et al., 1997)。JIP-1b は、全長 707 アミノ酸残基から構成される。JIP1b 482-547aa は プロリン繰り返し配列との結合が示されている src homology 3 (SH3)ドメイン、JIP-1b 558-707aa は phosphotyrosine -binding (PTB)を持っている。SH3 と PTB ドメインは、いずれもタンパク結合モチーフである。

6-1. LRP1B と JIP-1b は、動物細胞内で結合する

LRP1B と JIP-1b の結合を、yeast two-hybrid アッセイを用いて確認した。yeast two-hybrid アッセイは、酵母の核内でのタンパクの結合を確認する方法であるため、本来のタンパク修飾を受けない、本来の発現部位とは異なるといった問題点を持つ。これらの問題点を解決するために、哺乳類細胞内で免疫沈降法を行った。

LRP1B は、600kDa にも及ぶ巨大なタンパクであるため、cDNA レベルでの操作や形質転換によるタンパクの発現には限界がある。そこで、最小限の LRP1B の機能を持つ LRP1B mini-receptor を作成した。この LRP1B mini-receptor は、マウス LRP1B の 3307 から 4599 のアミノ酸から構成されている。免疫沈降法やウェスタンブロットに汎用できるように、1×FLAG タグを LRP1B mini-receptor のアミノ末端に付加した。この LRP1B mini-receptor は、1×FLAG タグ、膜貫通ドメイン、4 番目のリガンド結合ドメイン以降を持つことから、FLAG-mLRP1B4 と名付けた。

LRP1B と JIP-1b が、生理的に結合することを確かめるために、哺乳類細胞内で免疫沈降法を行った。

FLAG-mLRP1B4 と T7-JIP1b を、HEK293T 細胞に一過性に発現させ、ウェスタンブロットを行った。予想どおり、FLAG-mLRP1B4 は、抗 FLAG 抗体を用いて 200kDa 付近に、T7-JIP1b は、抗 T7 抗体を用いて 90kDa 付近に単一のバンドを検出した (図 11A)。次に、FLAG-mLRP1B4 と T7-JIP1b を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 T7 抗体を用いて T7-JIP1b のバンドを検出した。また、FLAG-mLRP1B4 と T7-JIP1b を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 T7 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-mLRP1B4 のバンドを検出した(図 11A)。期待どおり、LRP1B と JIP-1b

が哺乳類細胞内で結合していることが示された。

次に、LRP1 と JIP-1b が、生理的に結合することを確認するために、哺乳類細胞を用いて免疫沈降法を行った。

mLRP4 と T7-JIP1b を、HEK293T 細胞に一過性に発現させ、ウェスタンブロットを行った。予想どおり、mLRP4 は、抗 HA 抗体を用いて 200kDa 付近にバンドを検出した。mLRP4 と T7-JIP1b を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 T7 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 HA 抗体を用いて mLRP4 のバンドを検出した(図 11B)。期待どおり、LRP1 と JIP-1b が哺乳類細胞内で結合していることが示された。

6-2. LRP1B と JIP-1b は共局在する

次に LRP1B と JIP-1b の哺乳類細胞内での局在を調べ、結合可能であるかを確認するために、蛍光免疫染色法を行った。

FLAG-mLRP1B4 と myc-JIP1b を共に一過性に過剰発現させたマウス神経芽細胞腫株 N1E115 細胞を、抗 LRP1B 抗体を用いて LRP1B、抗 myc 抗体を用いて JIP-1b の局在を調べた。

その結果、LRP1B と JIP-1b は、核を除いた細胞内でドット状に局在していた(図 12a-b)。また LRP1B と JIP-1b の局在は、N1E115 細胞において、完全に一致していた(図 12c)。期待どおり、LRP1B と JIP-1b は、哺乳類細胞内で共局在していることから、結合可能であると考えられた。

6-3. LRP1B エクソン 91 内 NP_xY モチーフと JIP-1b PTB ドメインが結合する

これまでに、JIP-1b と JIP-2 は、LDL 受容体ファミリーの ApoER2, LRP1, Megalin の細胞内ドメインと結合することが報告されている(Gotthardt et al., 2000)。JIP-1b と JIP-2 は、SH3 ドメインと PTB ドメインのタンパク結合モチーフを持っており、今回 yeast two-hybrid スクリーニングにより得られた JIP-1b のクローンはすべて、完全な SH3 ドメインと PTB ドメインを保持していた(図9)。

そこで JIP-1b 側の結合領域の決定のために、JIP-1b の PTB ドメインのアミノ末端 47 アミノ酸残基を欠失しているアイソフォームである JIP-1, JIP-1b の PTB ドメインのみ(PTB), JIP-1b の SH3 ドメイン (Δ PTB) のコンストラクションを作製した(Inomata et al., 2003)。JIP-1b 側の結合領域を決定するために、yeast two-hybrid 法

のβ-ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)によるlac Z活性の定量化を行った。

その結果LRP1Bの細胞内ドメインは、JIP-1とJIP-1bのSH3ドメイン (ΔPTB)と結合せず、JIP-1bのPTBドメインのみ(PTB)と結合した(図13B)。

LRP1Bは、PTBドメインの典型的な結合配列であるNPxYモチーフを2つ有している。そこでLRP1Bの結合領域の決定のために、LRP1B細胞内ドメインのエクソン89にあるNPxYモチーフの変異体(NPxY1-mut)、LRP1B細胞内ドメインのエクソン91にあるNPxYモチーフの変異体(NPxY2-mut)、LRP1B細胞内ドメインのエクソン89と91にある両NPxYモチーフの変異体(NPxY1, 2-mut)を作製した(図8)。そして、LRP1B側の結合領域を決定するために、yeast two-hybrid法のβ-ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)によるlac Z活性の定量化を行った。

その結果JIP-1bは、NPxY1-mutと結合するが、NPxY2-mut或いはNPxY1, 2-mutと結合しなかった(図13A)。以上から、JIP-1bは、LRP1Bのエクソン91にあるNPxYモチーフと結合することが示唆された。

6-4. LRP1B と JIP-1b の結合は、JNK シグナル経路に影響しない

MAPK シグナル経路では、それぞれ生じるシグナルが、無関係な他の MAPK シグナル経路とクロストークしないように、厳密に制御する必要がある。足場タンパクは、MAPK シグナル経路を構成する各分子と結合して、複合体を形成することにより、特定のシグナルカスケードを迅速かつ正確に機能させている。MAPK の1つである JNK は、放射線、紫外線などの多岐にわたるストレスにตอบสนองして活性化されるプロテインキナーゼである。哺乳細胞において、JIP-1 は、MLK3 (mixed-lineage kinase 3) - MMK7 (MAP kinase kinase 7) -JNK の各分子と結合する(Whitmarsh et al., 1998) (Yasuda et al., 1999)。また JIP-1 遺伝子欠損マウスは、ストレスにより誘導される JNK の活性化とアポトーシスが抑制される(Whitmarsh et al, 2001)。したがって、JIP-1 は、JNK シグナル経路の伝達に重要な役割を持つと考えられる。

本研究では、LRP1B 或いは LRP1 と JIP-1b 間の結合が、JNK シグナル経路に影響を与えるかを検討した。

FLAG -mLRP1B4 或いは mLRP4、His•S-JNK、T7-JIP-1b を一過性に過剰発現させた HEK293T 細胞を紫外線照射した後、タンパクを回収し、抗 JNK 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。その結果、UV 照射によるストレスの有無に関わらず、FLAG -mLRP1B4 或いは mLRP4 の量を

段階的に増加しても、それに伴う JNK の活性化は起こらなかった(図 14, 図 15)。これらの結果より、LRP1B と LRP1 は、JNK シグナル伝達経路に関与しないことを示した。

7. RanBPM

RanBPM は、Ran と結合するタンパクとして、yeast two-hybrid スクリーニングにより同定された (Yokoyama et al., 1995)。RanBPM は、全長 652 アミノ酸残基から構成され、RanBPM 137-258aa に SPRY (repeats in splA and RyR) ドメインを持っている(Wang et al., 2002)。

7-1. LRP1B と RanBPM は、動物細胞内で結合する

LRP1B と RanBPM が、生理的に結合することを確かめるために、哺乳類細胞内で免疫沈降法を行った。

FLAG-mLRP1B4 と T7-RanBPM を、HEK293T 細胞に一過性に発現させ、ウエスタンブロットを行った。予想どおり、FLAG-mLRP1B4 は、抗 FLAG 抗体を用いて 200kDa 付近に、T7-RanBPM は、抗 T7 抗体を用いて 85kDa 付近に単一のバンドを検出した (図 16A)。次に、FLAG-mLRP1B4 と T7-RanBPM を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 T7 抗体を用いて T7-RanBPM のバンドを検出した。また、FLAG-mLRP1B4 と T7-RanBPM を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 T7 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-mLRP1B4 のバンドを検出した(図 16A)。期待どおり、LRP1B と RanBPM が哺乳類細胞内で結合していることが示された。

次に、LRP1 と RanBPM が、生理的に結合することを確かめるために、哺乳類細胞内で免疫沈降法を行った。

mLRP4 と FLAG-RanBPM を、HEK293T 細胞に一過性に発現させ、ウエスタンブロットを行った。予想どおり、mLRP4 は、抗 HA 抗体を用いて 200kDa 付近にバンドを検出した。mLRP4 と FLAG-RanBPM を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 HA 抗体を用いて mLRP4 のバンドを検出した(図 16B)。期待どおり、LRP1 と RanBPM が哺乳類細胞内で結合していることが示された。

7-2. RanBPMはLRP1B細胞内ドメインの特定配列を認識して結合しない

RanBPMは、アミノ末端にSPRYドメインを持つタンパクである(図9)。SPRYドメインは、タンパク結合モチーフであると推察されているが、明確な機能は未知である(Woo et al., 2006)。今回yeast two-hybridスクリーニングにより得られたRanBPMのクローンは、すべて完全なSPRYドメインを保持していた(図9)。このSPRYドメインは、特定の配列を認識して結合するのではなく、標的分子の立体構造を認識して結合することが報告されている(Woo et al., 2006)。

まず RanBPM が、LRP1B の細胞内ドメインのどの部位と結合しているかを調べた。LRP1B の細胞内ドメインは、エクソン 89 から 91 により構成されている。このエクソン 89 から 91 の各エクソン(exon89, exon90, exon91)、エクソン 89 と 90 の組み合わせ(exon89, 90)、エクソン 90 と 91 の組み合わせ(exon90, 91)、エクソン 89 と 91 からなるスプライシングアイソフォーム(exon89, 91)を作製した。そして、RanBPM 側の結合領域を決定するために、yeast two-hybrid 法の β -ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)による lac Z 活性の定量化を行った。

その結果RanBPMは、LRP1Bのエクソン90のみ、エクソン89と90に強く結合した。またRanBPMは、LRP1Bのエクソン90と91、エクソン89と91からなるスプライシングアイソフォームにも結合した(図17)。このことからRanBPMが、LRP1Bのどの部位を認識して結合しているかを決定出来なかった。

7-3. LRP1B と RanBPM の結合は、MAP キナーゼ経路に影響しない

RanBPM は、リガンドの有無に関係なく、受容体型チロシンキナーゼの 1 つである MET と結合する(Wang et al., 2002)。MET は、HGF (Hepatocyte growth factor)に対する受容体であり、細胞増殖・形態形成・運動性といった生理的機能に関与している(Balkovetz et al., 1999)。HGF の MET への結合が、MET の 2 量体化、キナーゼ活性化、細胞質ドメインのチロシンリン酸化を引き起こす。MET の自己チロシンリン酸化は、MET への Grb2 (growth factor receptor -bound protein 2)の結合を促し、その活性化シグナルを Grb2-SOS から Ras - ERK (extracellular signal -regulated kinase)や JNK へ伝達する。また RanBPM は、Ras の GDP/GTP 交換因子である SOS に結合し、Ras の恒常活性に関わるタンパクである(Wang et al., 2002)。

RanBPM は、細胞接着因子 L1 と結合し、L1 に起因する ERK シグナル経路の活性を阻害する(Cheng et al., 2005)。L1 は、免疫グロブリンスーパーファミリー

に属する膜タンパクで、軸索伸長・神経回路形成といった生理的機能に関与している(上口, 2000)。L1は、下流の細胞内シグナル伝達経路および自身の内在化により、成長円錐の接着性を動的に制御している。その過程でL1は、ERKシグナル経路を活性化し、自身の内在化を促すことにより、軸索伸長に関わる(Schaefer et al., 1999)。

以上のようにRanBPMは、ERKシグナル経路を正と負のいずれにも調節することが報告されている。

本研究では、LRP1BとRanBPM間の結合が、ERKシグナル経路に影響を与えるかについて、c-fos遺伝子のプロモーター領域に位置するSRE (serum responsive element) 配列をルシフェラーゼ(Luc)遺伝子に組み込んだレポーター(SRE-LUC)を用いた、レポーターアッセイにより検討した。

まずRanBPMが、ERKシグナル経路に影響するかを調べた。T7-RanBPMと、SRE-LUCをCOS7細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、COS7細胞では、RanBPMの量を段階的に増加していくと、それに伴いSRE-LUCのルシフェラーゼ活性の増加を観察した(図18)。

次にLRP1BとRanBPM間の結合が、ERKシグナル経路に影響を与えるかを調べた。FLAG-mLRP1B4、T7-RanBPMとSRE-LUCをCOS7細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、RanBPMの有無に関わらず、COS7細胞では、LRP1Bの量を段階的に増加しても、それに伴うSRE-LUCのルシフェラーゼ活性への影響を受けなかった(図19A)。

さらにLRP1とRanBPM間の結合が、ERKシグナル経路に影響を与えるかを調べた。mLRP4、T7-RanBPMとSRE-LUCをCOS7細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、RanBPMの有無に関わらず、COS7細胞では、LRP1の量を段階的に増加しても、それに伴うSRE-LUCのルシフェラーゼ活性への影響を受けなかった(図19B)。

RanBPMのERKシグナル経路への影響は、細胞の種類により、異なる可能性があるため、HEK293T細胞で同様の実験を行った。

まずRanBPMが、ERKシグナル経路に影響するかを調べた。T7-RanBPMと、SRE-LUCをHEK293T細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、HEK293T細胞では、RanBPMの量を段階的に増加しても、それに伴うSRE-LUCのルシフェラーゼ活性への影響を受けなかった(図20)。

次にLRP1BとRanBPM間の結合が、ERKシグナル経路に影響を与えるかを

調べた。FLAG-mLRP1B4、T7-RanBPM と SRE-LUC を HEK293T 細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、HEK293T 細胞では、LRP1B の量を段階的に増加していくと、それに伴い SRE-LUC のルシフェラーゼ活性の増加を観察した(図 21A)。しかし、この LRP1B による ERK シグナルの増大は、RanBPM の有無で明確な差を生じなかった(図 21A)。

一方 LRP1 と RanBPM 間の結合が、ERK シグナル経路に影響を与えるかを調べた。mLRP4、T7-RanBPM と SRE-LUC を HEK293T 細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、HEK293T 細胞では、LRP1 の量を段階的に増加しても、それに伴う SRE-LUC のルシフェラーゼ活性への影響を受けなかった(図 21B)。

実際に HEK293T 細胞において、LRP1B が、ERK の活性を促すかを検討した。FLAG -mLRP1B4 を一過性に過剰発現させた HEK293T 細胞から、タンパクを回収し、抗 ERK 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体、抗 JNK 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。

その結果、LRP1B を過剰発現させた細胞において、活性型 ERK の割合が、若干高かった(図 22A and B)。しかし、活性型 JNK の割合には違いが見られなかった(図 22A and C)。これは、LRP1B が、ERK シグナル伝達経路に関与する可能性を示した。

7-4. LRP1B と RanBPM の結合は、転写活性に影響しない

RanBPM は、AR (アンドロゲン受容体)、糖質コルチコイド受容体、THR (甲状腺ホルモン受容体)といった核内受容体と結合する(Rao et al., 2002) (Poirier et al., 2006)。核内受容体は、リガンドとの結合により活性化し、直接特定の遺伝子の転写を調節している。RanBPM は、これら核内受容体の転写活性を正に調節する、コアクチベータとして機能することが、報告されている(Rao et al., 2002) (Poirier et al., 2006)。

また膜貫通タンパクのタンパク分解産物が、核内において、遺伝子発現を促進することが報告されている(Cao et al., 2001)。LRP1B や LRP1 は、MMP (Matrix metalloproteinase)や ADAM (A disintegrin and metalloproteinase)による細胞外マトリックス側の分解後に、 γ -secretase 複合体による膜内タンパク分解を受け、細胞内ドメインの代謝産物を生じる。その細胞内ドメインの代謝産物は、核に移行

することが報告されている(Liu et al., 2007a) (May et al., 2002)。

そこで本研究では、LRP1B の細胞内ドメインと LRP1 の細胞内ドメインが、遺伝子発現に関与するのかを検討した。

GAL4-DNA 結合ドメイン(GAL4-DBD)に融合した LRP1B 細胞内ドメインの発現ベクター(GAL4-LRP1BICD)と、TK プロモーターを持つルシフェラーゼ遺伝子上流に 5 つの GAL4 結合配列を持つレポータープラスミド(pGL3-G5-TK)、或いは GAL4 結合配列を持たないレポータープラスミド(pGL3-TK)を HEK293T 細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、GAL4-LRP1BICD の量を段階的に増加しても、GAL4 結合配列を持つレポーター遺伝子と GAL4 結合配列を持たないレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性に差はなかった(図 23A)。

GAL4-DBD に融合した LRP1 細胞内ドメインの発現ベクター(GAL4-LRP1ICD)を用いて、同様の実験をおこなった。その結果、GAL4-LRP1ICD の量を段階的に増加していくと、それに伴い GAL4 結合配列を持つレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性の増加を観察した(図 23B, left)。しかし、GAL4 結合配列を持たないレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性も同様に増加を観察した(図 23B, right)。

これらの結果から、LRP1B の細胞内ドメインと LRP1 の細胞内ドメインが、遺伝子発現に関与しないことがわかった。

次に RanBPM が、LRP1B の細胞内ドメインと LRP1 の細胞内ドメインの転写に影響するかを検討した。

GAL4-LRP1BICD 或いは GAL4-LRP1ICD、T7-RanBPM と、pGL3-G5-TK を HEK293T 細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、T7-RanBPM の量を段階的に増加しても、GAL4 結合配列を持つレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性への影響を観察されなかった(図 24)。

これらの結果から、RanBPM が、LRP1B の細胞内ドメインと LRP1 の細胞内ドメインの転写に影響しないことがわかった。

8. Grb7

Grb7 は、チロシンリン酸化された EGF 受容体のカルボキシル断片と結合するタンパク質として、同定された (Margolis et al., 1992)。Grb7 は、全長 535 アミ

ノ酸残基から構成される。Grb7 99-181aa は RA (Ras association) ドメイン、Grb7 228-341aa は PH (pleckstrin homology) ドメイン、Grb7 434-515aa は SH2 (src homology 2) を持っている。これらのドメインは、タンパク結合モチーフである。

8-1 Grb7 はエクソン 91 の NPxY モチーフ変異体に結合しない

Grb7 は、アミノ末端に RA ドメイン、中央部分に PH ドメイン、カルボキシル末端に SH2 ドメイン構造を持つタンパクである(図 9)。今回の yeast two-hybrid スクリーニングにより得られた Grb7 のクローンは、PH ドメインと SH2 ドメインを保持していた(図 9)。PH ドメインは、リン酸化イノシトール結合ドメインであり、SH2 ドメインは、リン酸化チロシンに結合することが知られている。

そこで、Grb7 とチロシン残基の変異体である LRP1B 細胞内ドメインのエクソン 89 の NPxY モチーフ変異体(NPxY1-mut)、LRP1B 細胞内ドメインのエクソン 91 の NPxY モチーフ変異体(NPxY2-mut)、LRP1B 細胞内ドメインのエクソン 89 と 91 の両 NPxY モチーフ変異体(NPxY1, 2-mut) との結合を検討するために、yeast two-hybrid 法の β -ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)による lac Z 活性の定量化を行った。

その結果 Grb7 は、NPxY1-mut と結合するが、NPxY2-mut 或いは NPxY1, 2-mut と結合しなかった(図 25)。以上より、LRP1B のエクソン 91 にある NPxY モチーフが、Grb7 との結合に関与することが示唆された。

9. SNTG2

SNTG2 は、EST データベース検索により、 γ -syntrophin のホモログとして同定された (Piluso et al., 2000)。SNTG2 は、全長 539 アミノ酸残基から構成される。SNTG2 72-153aa は PDZ ドメイン、SNTG2 299-419aa は PH ドメイン、SNTG2 466-525aa は SU (Syntrophin Unique) ドメインを持っている。これらのドメインは、タンパク結合モチーフである (Piluso et al., 2000)。

9-1. LRP1B の C 末端 3 アミノ酸残基は SNTG2 との結合に必須である

SNTG2 は、アミノ末端に PDZ ドメイン、中央部分に PH ドメイン、そしてカルボキシル末端に SU ドメインを保持している。SU ドメインは、ジストロフィンファミリー結合ドメインと推定されている (Ehmsen et al., 2002)。今回 yeast two-hybrid

スクリーニングにより得られたSNTG2のクローンは、完全なPDZドメインを保持していた(図9)。またLRP1Bは、PSD-95のPDZドメインと結合することが報告されている(Marchang et al., 2004)。

このことから、LRP1Bは、SNTG2のPDZドメインと結合しているのではないかと考えた。PDZドメインは、標的分子のカルボキシ末端を認識して、結合するものが多い(Songyang et al., 1997)。また、LRP1Bのカルボキシ末端は、Thr-Val-Alaであり、これは、クラスI結合モチーフと一致する。そこで、SNTG2とLRP1Bのカルボキシ末端3アミノ酸残基を欠失させた変異体(LRP1BICD Δ 3aa)との結合を検討するために、yeast two-hybrid法の β -ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)によるlac Z活性の定量化を行った。

その結果、SNTG2は、LRP1BICD Δ 3aaと結合しなかった(図26)。このことから、LRP1Bのカルボキシ末端3アミノ酸がSNTG2との結合に関係していることが示唆された。

10. PICK1

PICK1は、PKC (プロテインキナーゼ C)と結合するタンパク質として、yeast two-hybrid スクリーニングにより同定された (Staudinger et al., 1995)。PICK1は、全長 416 アミノ酸残基から構成される。PICK1 22-105aa は PDZ (PSD95 (Post synaptic density protein), DlgA (Drosophila disc large tumor suppressor), and zo-1 (Zonula occludens-1 protein)) ドメイン、PICK1 151-355aa は BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs)ドメインを持っている(Staudinger et al., 1997) (Peter et al., 2004)。

10-1. LRP1B と PICK1 は、動物細胞内で結合する

LRP1B と PICK1 が、生理的に結合することを確かめるために、哺乳類細胞内で免疫沈降法を行った。

FLAG-mLRP1B4 と PICK1-myc を、HEK293T 細胞に一過性に発現させ、ウェスタンブロットを行った。予想どおり、FLAG-mLRP1B4 は、抗 FLAG 抗体を用いて 200kDa 付近に、PICK1-myc は、抗 myc 抗体を用いて 50kDa 付近に単一のバンドを検出した (図 27A)。次に、FLAG-mLRP1B4 と PICK1-myc を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 myc 抗体を

用いて PICK1-myc のバンドを検出した。また、FLAG-mLRP1B4 と PICK1-myc を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 myc 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-mLRP1B4 のバンドを検出した(図 27A)。期待どおり、LRP1B と PICK1 が哺乳類細胞内で結合していることが示された。

次に、LRP1 と PICK1 が、生理的に結合することを確認するために、哺乳類細胞内で免疫沈降法を行った。

mLRP4 と PICK1-myc を、HEK293T 細胞に一過性に発現させ、ウェスタンブロットを行った。予想どおり、mLRP4 は、抗 HA 抗体を用いて 200kDa 付近にバンドを検出した。mLRP4 と PICK1-myc を共発現させた HEK293T 細胞を、抗 myc 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 HA 抗体を用いて mLRP4 のバンドを検出した(図 27B)。期待どおり、LRP1 と PICK1 が哺乳類細胞内で結合していることが示された。

10-2. LRP1B と PICK1 は共局在する

次に LRP1B と PICK1 の哺乳類細胞内での局在を調べ、結合可能であるかを確認するために、蛍光免疫染色法を行った。

FLAG-mLRP1B4 と PICK1-myc を共に一過性に過剰発現させたマウス神経芽細胞腫株 N1E115 細胞を、抗 LRP1B 抗体を用いて LRP1B、抗 myc 抗体を用いて PICK1 の局在を調べた。

その結果、LRP1B と PICK1 は、核を除いた細胞内でドット状に局在していた(図 28a-b) また LRP1B と PICK1 の局在は、N1E115 細胞において、完全に一致していた(図 28c)。期待どおり、LRP1B と JIP-1b は、哺乳類細胞内で共局在していることから、結合可能であると考えられた。

10-3. LRP1B の C 末端 3 アミノ酸残基と PICK1 の PDZ ドメインが結合する

今回 yeast two-hybrid スクリーニングにより得られた PICK1 のクローンは、すべて完全長の PICK1 であった (図9)。PICK1 は、アミノ末端に PDZ ドメインとカルボキシ末端に BAR ドメインを持つタンパクである(図9)。PDZ ドメインは、タンパク結合モチーフであり、BAR ドメインは、高度に保存された二量体形成ドメインである。また LRP1B や LRP1 は、PSD-95 の PDZ ドメインと結合することが報告されている(Marchang et al., 2004) (Gotthardt et al., 2000)。

このことから、LRP1Bは、PICK1のPDZ ドメインと結合しているのではないかと考えた。PDZドメインと標的分子の結合は、PDZ ドメイン内のカルボキシ末端結合ループと標的分子のカルボキシ末端に依存する。この結合は、PDZドメインがつくった疎水性のポケットに、標的分子が手を入れるようなイメージである(Doyle et al., 1996)。PICK1のPDZ ドメイン内のカルボキシ末端結合ループは、PICK1の27から33番目のアミノ酸で構成されており、標的分子のカルボキシ末端の認識に必須であることが報告されている(Staudinger et al., 1997) (Dev et al., 2004)。そこで、LRP1BとPICK1との結合にはカルボキシ末端結合ループが重要であることを調べるために、PICK1の27番目のリシン残基をグルタミン酸に置換した変異体(PICK1 K27E)とPICK1の27番目のリシン残基と28番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体(PICK1 KD27,28AA)を作製した。そして、PICK1側の結合領域を決定するために、yeast two-hybrid法の β -ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)によるlac Z活性の定量化を行った。

その結果LRP1Bの細胞内ドメインは、PICK1のカルボキシ末端結合ループ変異体のPICK1 K27EとPICK1 KD27,28AAと結合しなかった(図29B, left)。また、LRP1の細胞内ドメインも、PICK1のカルボキシ末端結合ループ変異体のPICK1 K27EとPICK1 KD27,28AAと結合しなかった(図29B, right)。このことから、PICK1のPDZドメイン内のカルボキシ末端結合ループが、LRP1B或いはLRP1の細胞内ドメインとの結合に関係していることが示された。

PDZドメインは、標的分子のカルボキシ末端3から7アミノ酸残基を認識し、結合するものが多い(Songyang et al., 1997)。実際PICK1のPDZドメインは、クラスI結合モチーフ(Ser/ Thr -X - Φ ; X, すべてのアミノ酸残基、 Φ , 疎水性アミノ酸残基)とクラスII結合モチーフ(Φ -X - Φ)に結合することが報告されている(Madsen et al., 2005)。

LRP1Bのカルボキシ末端は、Thr-Val-Alaであり、これは、クラスI結合モチーフと一致する。そこで、LRP1Bのカルボキシ末端3 アミノ酸残基を欠失させた変異体(LRP1BICD Δ 3aa)を作成した。またLRP1のカルボキシ末端は、Pro-Leu-Alaであり、これは、クラスII結合モチーフと一致する。そこで、LRP1のカルボキシ末端3 アミノ酸残基を欠失させた変異体(LRP1ICD Δ 3aa)を作成した。そして、LRP1BとLRP1側の結合領域を決定するために、yeast two-hybrid法の β -ガラクトシダーゼ活性測定(ONPG assay)によるlac Z活性の定量化を行った。

その結果、PICK1は、LRP1BとLRP1のカルボキシ末端3 アミノ酸残基を欠失

させた変異体LRP1BICD Δ 3aa或いはLRP1ICD Δ 3aaと結合しなかった(図29A)。このことから、LRP1BとLRP1のカルボキシ末端3アミノ酸がPICK1との結合に関係していることが示唆された。

10-4. PICK1 は LRP1B の内在化に影響する

GluR2 (Glutamate Receptor 2)は、AMPA 型受容体であり、GRIP (Glutamate Receptor Interacting protein)や PICK1 に結合している(Hirbec et al, 2002)。GluR2 のカルボキシル末端にある 880 番目のセリン残基の PKC によるリン酸化は、GluR2 から GRIP を解離し、その後 GluR2 は、細胞内に引き込まれる(Matsuda et al., 1999) (Matsuda et al., 2000)。しかし、GluR2 の 880 番目のセリン残基のリン酸化は、PICK1 との結合に影響しない(Chung et al., 2000)。この GluR2 と GRIP の解離による、GluR2 と PICK1 の結合が、長期抑制に重要である(Xia et al., 2000) (Chung et al., 2003) (Seidenman et al., 2003) (Steinberg et al., 2006)。GluR2 の内在化が、PICK1 の過剰発現系において、亢進することも報告されている(Terashima et al, 2004)。

本研究では、LRP1B と PICK1 間の結合が、LRP1B の内在化に影響を与えるかについて、ビオチンを用いた内在化のアッセイにより検討した。ビオチンを用いた内在化のアッセイは、以下の手順で行った。細胞膜表面上の膜タンパクを、ビオチン (Sulfo-NHS-SS-Biotin)で標識し、膜タンパクの細胞内取り込みを誘導する。次に、グルタチオンを用いて、細胞内に取り込まれず細胞膜表面上に残存するビオチン標識膜タンパクから、ビオチンを遊離させた後、タンパクを回収した。そして、streptavidin agarose を用いて、細胞内に取り込まれたビオチン標識膜タンパクを回収し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットにより、細胞内に取り込まれた LRP1B 量を定量した。

まず細胞膜上の LRP1B が、ビオチン標識され、streptavidin agarose を用いて回収可能かを検討した。

FLAG-mLRP1B4 を一過性に過剰発現させた HEK293T 細胞の細胞膜上タンパクを、ビオチン標識した。グルタチオンによるビオチンの遊離を行った上で、タンパクを回収し、streptavidin agarose によるビオチン標識膜タンパクの回収を行った。そして、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

その結果 LRP1B は、グルタチオンによるビオチンの遊離を行わない場合、streptavidin agarose により回収されるが(図 30 上段, lane 1 and 3)、グルタチオン

によるビオチンの遊離を行った場合、streptavidine agarose により回収されない(図 30 上段, lane 2 and 4)。このことから、ビオチン標識内在化アッセイは、LRP1B に有用である。

同様に、細胞膜上の LRP1 が、ビオチン標識され、streptavidin agarose を用いて回収可能かを検討した。

その結果 LRP1 は、グルタチオンによるビオチンの遊離を行わない場合にも、streptavidine agarose により回収されない(図 30 下段, lane 1 and 3)。このことから、ビオチン標識内在化アッセイは、LRP1 に有用でない。

ビオチン標識内在化アッセイが LRP1B に有用であったので、LRP1B の内在化が PKC の活性により或は PICK1 の存在により促進されるを検討した。FLAG-mLRP1B4 単独または PICK1-myc と共に一過性に過剰発現させた HEK293T 細胞の細胞膜上タンパクを、ビオチン標識し、膜タンパクの細胞内取り込みを誘導する。グルタチオンによる細胞膜表面にある膜タンパクからビオチンの遊離を行った上で、タンパクを回収し、streptavidine agarose によるビオチン標識膜タンパクの回収を行った。そして、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。膜タンパクの細胞内取り込みの誘導は、37°Cでのインキュベーションのみ、若しくは TPA の添加と 37°Cでのインキュベーションで検討した。

その結果、ビオチン標識直後、グルタチオンによるビオチンの遊離の有無で比較した場合、グルタチオン処理を施さない細胞において、LRP1B を多く回収した(図 31, lane 1 and 2, lane 5 and 6)。これは、ビオチン標識された LRP1B のビオチンが、グルタチオンによって、遊離していることを示している。LRP1B の細胞内取り込みは、37°Cでのインキュベーションにより促進された(図 31, lane 2 and 3)。しかし LRP1B の細胞内取り込みは、TPA の添加と 37°Cでのインキュベーションにより阻害された(図 31, lane 2-4)。さらに LRP1B の細胞内取り込みは、PICK1 の存在下で促進された(図 31, lane 3 and 7)。

10-5. LRP1B は *in vitro* で PKC α によりリン酸化される

PICK1 は、AMPA 型グルタミン酸受容体以外にも、代謝型グルタミン酸受容体に結合する(Hirbec et al, 2002)。PICK1 の mGLUR7 との結合は、PKC による mGLUR7 のリン酸化を阻害する(Dev et al., 2000)。この様に PICK1 は、間接的に PKC によるシグナル伝達を調節している可能性がある。

本研究では、LRP1B と PICK1 間の結合が、LRP1B の細胞内ドメインのリン酸

化を正或いは負に調節するかを検討した。LRP1B の細胞内ドメインのリン酸化は、LRP1B の生理機能を調節していることが期待できる。

LRP1 は、PKC α によりリン酸化される(Ranganathan et al., 2004)。LRP1B の細胞内ドメインには、PKCのコンセンサス配列((Arg/ Lys1-3, X2-0)-Ser*/ Thr*-(X2-0, Arg/ Lys1-3)>Ser*/ Thr*-(X2-0, Arg/ Lys1-3) \cong (Arg/ Lys1-3, X2-0)-Ser*/ Thr* (X, すべてのアミノ酸)) (Kennelly et al., 1991) が複数箇所ある。そこで LRP1B の細胞内ドメインが、in vitro で、PKC α によりリン酸化されるかを調べるために、アミノ末端に 6 \times His タグを付加した LRP1B の細胞内ドメイン全長(LRP1B 4467-4599aa)の融合タンパク His-LRP1BICD を作製した。

作製した His-LRP1BICD は、CBB (Coomassie brilliant blue)染色により確認し、予想どおり 25kDa 付近にバンドを確認した(図 32A)。同様に、アミノ末端に 6 \times His タグを付加した LRP1 の細胞内ドメイン全長(LRP1 4446-4545aa)の融合タンパク His-LRP1ICD、アミノ末端に MBP(マルトース結合タンパク)タグを付加した PICK1 全長の融合タンパク MBP-PICK1、MBP を作製、CBB 染色で確認し、予想どおりそれぞれ 20kDa, 90kDa, 43kDa 付近にバンドを確認した(図 32A)。

次に His-LRP1BICD が、PKC α によりリン酸化されるかを調べるために、[γ -³²P]ATP の存在下において、相同組み換え体 PKC α と His-LRP1BICD を反応することにより、in vitro kinase assay を行った。図 32B に示したように、His-LRP1BICD は、PKC α によりリン酸化された。同様に His-LRP1ICD と MBP-PICK1 も、in vitro で PKC α によりリン酸化されたが、MBP はリン酸化されなかった(図 32B)。His-LRP1BICD は、His-LRP1ICD や MBP-PICK1 よりも 100 倍程度強く、PKC α によりリン酸化された(図 32B)。また His-LRP1BICD, His-LRP1ICD, MBP-PICK1 は、PKC α 非存在下において、³²P の取り込みが起きなかった(results not shown)。この結果は、His-LRP1BICD, His-LRP1ICD, MBP-PICK1 がキナーゼ活性を持たないことを、示唆している。以上から、in vitro で His-LRP1BICD は、His-LRP1ICD や MBP-PICK1 よりも、PKC α に対してより良い基質であることがわかった。

10-6. PICK1 は PKC α による LRP1B のリン酸化を阻害する

PICK1 は、PKC α と結合している(Staudinger et al., 1997)。また本研究で、PICK1 が、LRP1B や LRP1 と結合していることを確認した。LRP1B と PICK1 間の結合が、PKC α による LRP1B のリン酸化に影響するかについて検討した。

はじめに、PKC α による LRP1B 細胞内ドメインのリン酸化と PICK1 間の相関性の有無を検討した。MBP-PICK1 と His-LRP1BICD を反応することで結合を誘導した後、His-LRP1BICD の PKC α によるリン酸化を調べた。PKC α による His-LRP1BICD のリン酸化は、MBP-PICK1 の非存在下で生じる(図 32B and 図 33A)。この PKC α による His-LRP1BICD のリン酸化は、His-LRP1BICD と等量の MBP-PICK1 の存在下で、25%阻害され、さらに His-LRP1BICD と 10 倍量の MBP-PICK1 の存在下で、40%阻害された(図 33A)。また PKC α による His-LRP1BICD のリン酸化は、MBP により阻害されないが、MBP-PICK1 により阻害された(図 34A)。

次に LRP1B 細胞内ドメインと PICK1 間の結合が、PKC α による LRP1B 細胞内ドメインのリン酸化に関与しているかを検証した。PICK1 と結合しない LRP1B 細胞内ドメイン変異体(LRP1B 4467-4596aa) (His-LRP1BICD Δ 3aa)を作製した。His-LRP1BICD Δ 3aa は、PKC α によりリン酸化された(図 33B)。そして PKC α による His-LRP1BICD Δ 3aa のリン酸化は、MBP-PICK1 の存在量に関係なく起こっていた(図 33B and 図 34B)。この結果は、LRP1B 細胞内ドメインと PICK1 間の結合が、PKC α による LRP1B 細胞内ドメインのリン酸化の阻害に必要であることを示した。

さらに、PKC α による LRP1 細胞内ドメインのリン酸化と PICK1 間の相関性の有無を検討した。MBP-PICK1 と His-LRP1ICD を反応することで結合を誘導した後、His-LRP1ICD の PKC α によるリン酸化を調べた。PKC α による His-LRP1ICD のリン酸化は、PICK1 の非存在下で生じる(図 32B and 34C)。また PKC α による His-LRP1ICD のリン酸化は、PICK1 に関係なく起こる(図 34C)。次に PICK1 と結合しない LRP1 細胞内ドメイン変異体(LRP1 4446-4542aa) (His-LRP1ICD Δ 3aa)を作製した。His-LRP1ICD Δ 3aa は、PKC α によりリン酸化された(図 34D)。同様に PKC α による His-LRP1ICD Δ 3aa のリン酸化は、PICK1 に関係なく起こる(図 34D)。この結果は、LRP1B 細胞内ドメインとは異なり、LRP1 細胞内ドメインと PICK1 間の結合が、PKC α による LRP1 細胞内ドメインのリン酸化に影響しないことを示した。また PKC α による MBP-PICK1 のリン酸化は、His-LRP1BICD や His-LRP1ICD により影響を受けなかった(図 35)。

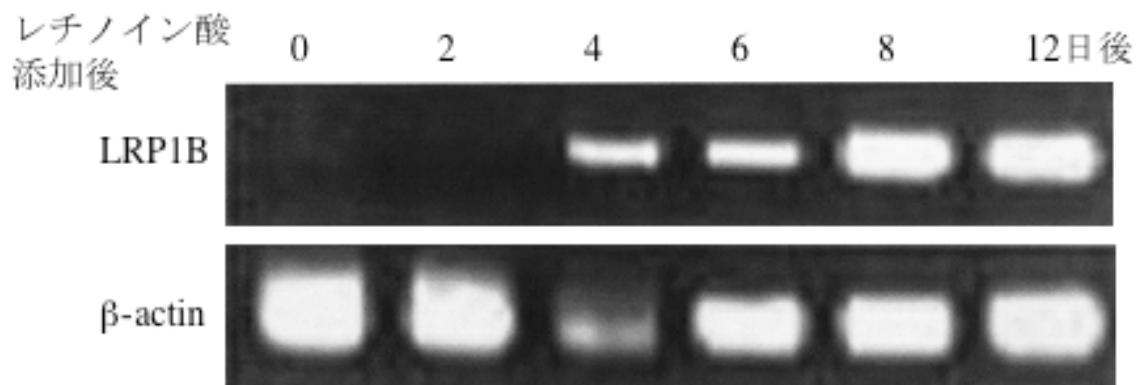


図 1 LRP1B 遺伝子の発現は P19 細胞の神経分化誘導後上昇する

P19 細胞は、レチノイン酸を含む培養液で培養後、細胞を集合させ、非接着プレート上で培養することにより、神経分化を誘導した。神経分化誘導前後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。LRP1B 遺伝子の発現は、神経分化誘導 4 日目付近から発現し始め、分化の進行と共に上昇した。

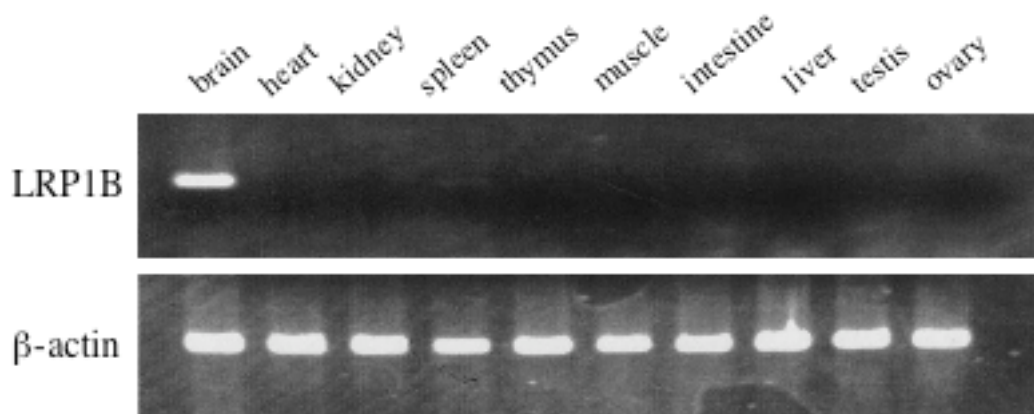


図 2 LRP1B 遺伝子は脳特異的に発現する

成体マウスの主な組織由来の RNA を用いて、RT-PCR を行った。LRP1B 遺伝子は脳特異的に発現していた。

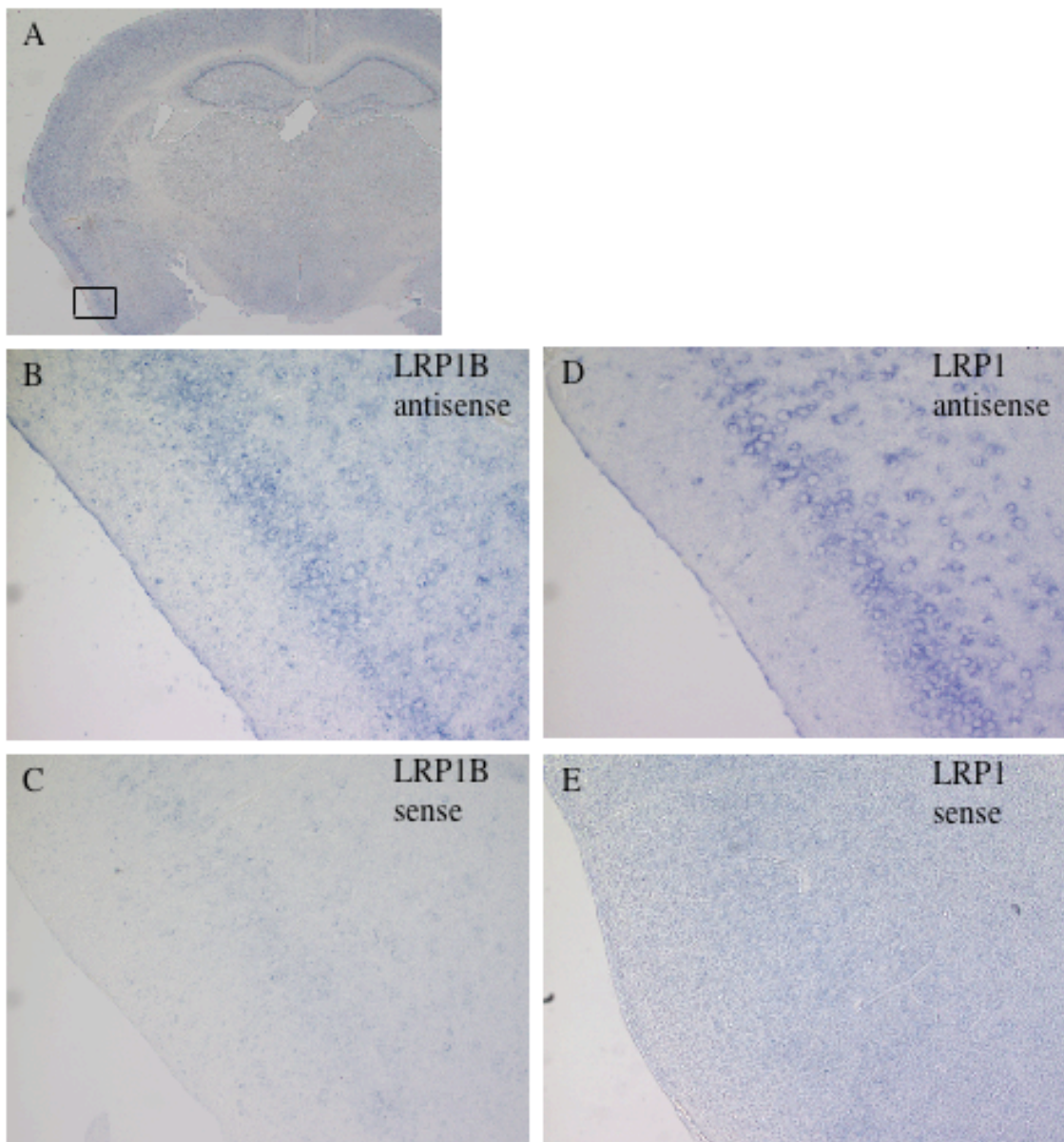


図3 成体マウスの大脳皮質における LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の発現の比較

A, 大脳の全体図。四角形で囲った大脳皮質領域の発現を調べた。B-E, LRP1B の antisense probe(B), LRP1B の sense probe(C), LRP1 の antisense probe(D), LRP1 の sense probe(E)を用いて、*in situ* hybridization 法を行った。その結果、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子は共に、主に大脳皮質の第2層から第6層において発現していた。

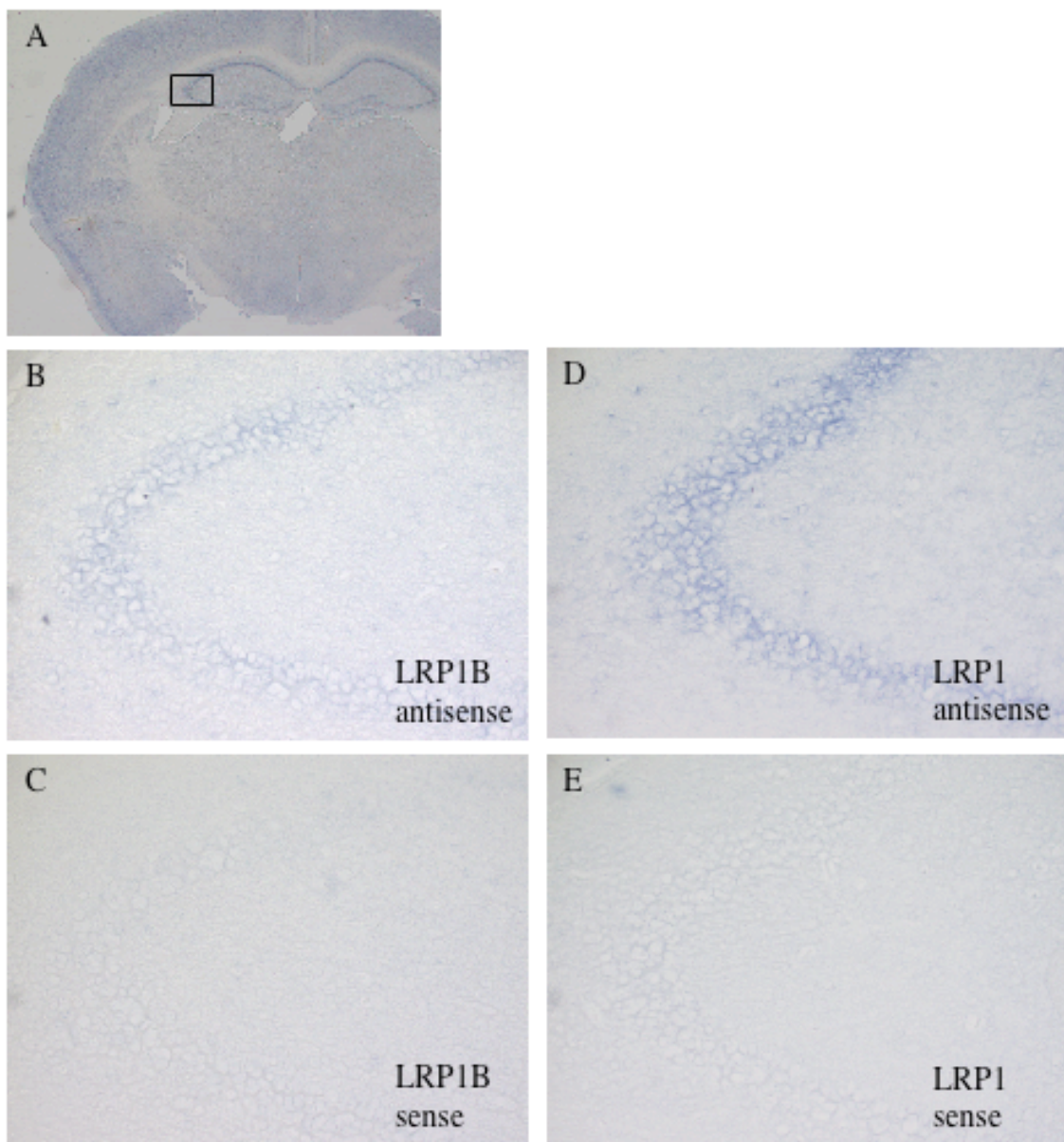


図4 成体マウスの海馬 CA3 領域における LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の発現の比較

A, 大脳の全体図。四角形で囲った部位が海馬の CA3 領域である。B-E, LRP1B の antisense probe(B), LRP1B の sense probe(C), LRP1 の antisense probe(D), LRP1 の sense probe(E)を用いて、*in situ* hybridization 法を行った。その結果、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子は共に、海馬 CA3 領域に存在する大きな細胞で発現していた。この細胞群は、おそらく錐体細胞である。

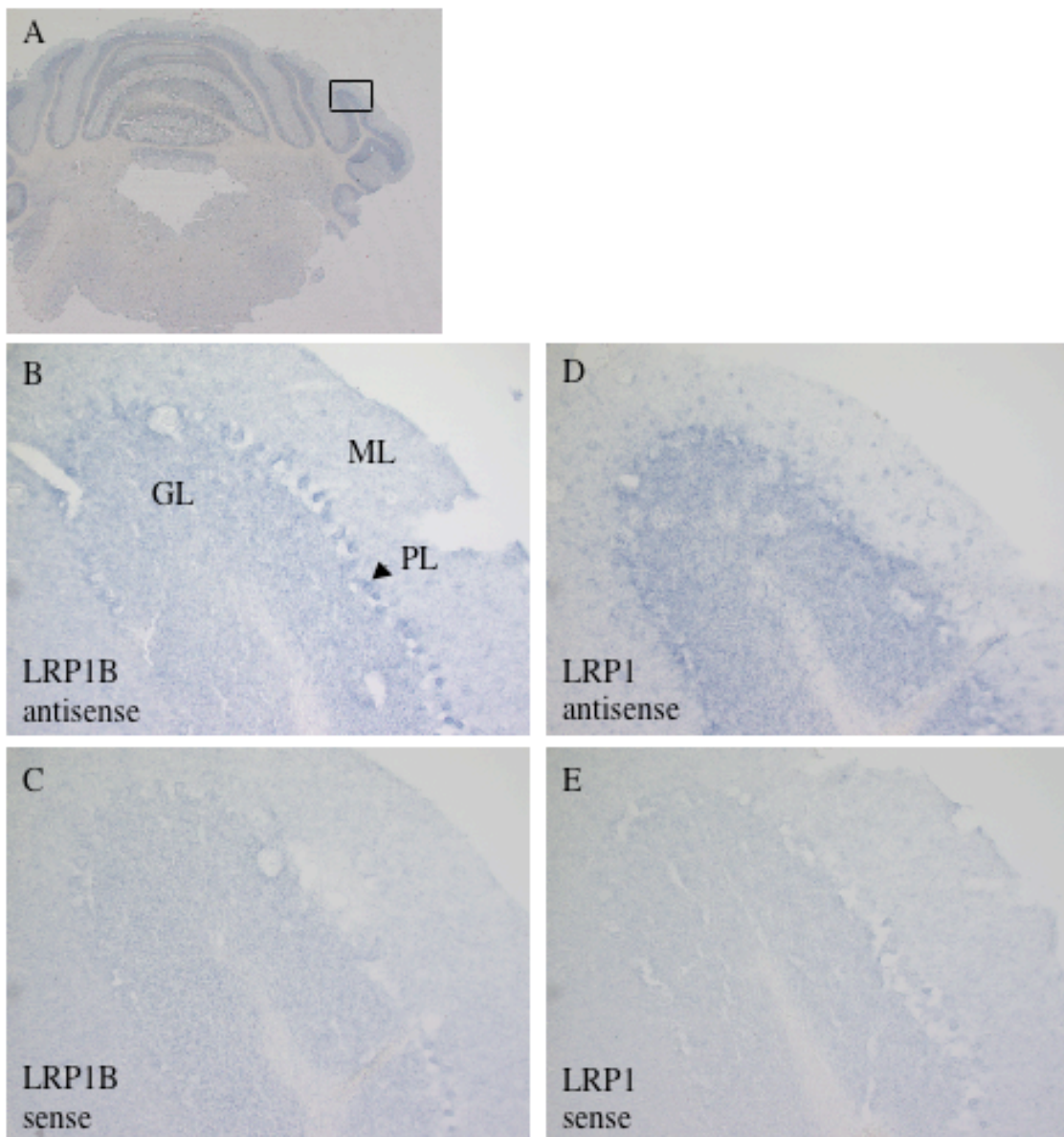
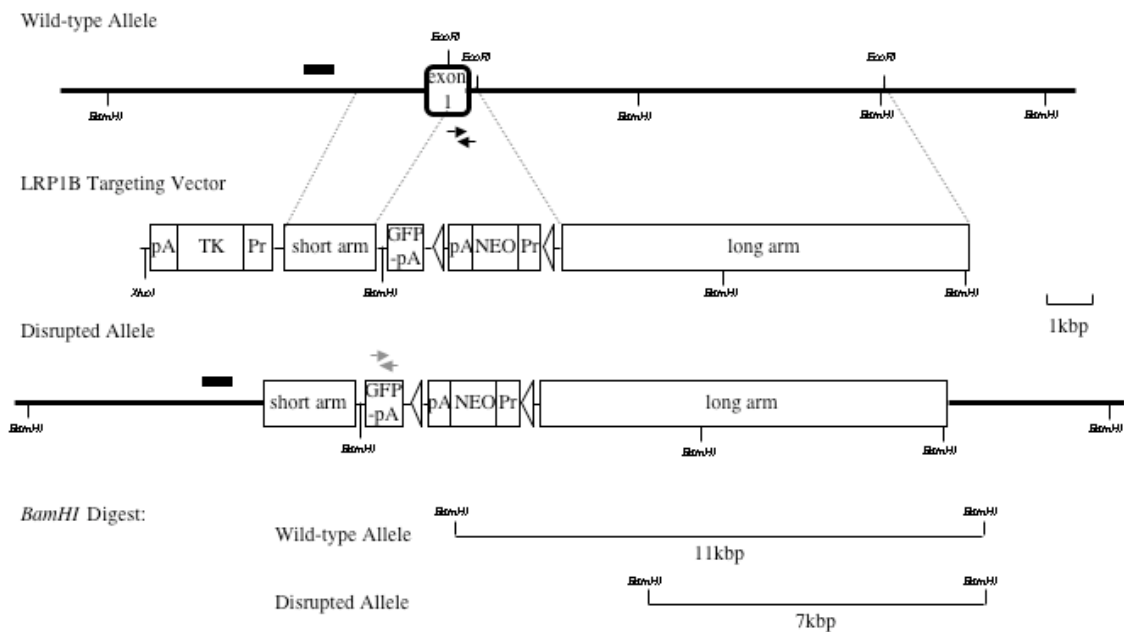


図5 成体マウスの小脳皮質における LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の発現の比較

A, 小脳の全体図。四角形で囲った部位の発現を調べた。B-E, LRP1B の antisense probe(B), LRP1B の sense probe(C), LRP1 の antisense probe(D), LRP1 の sense probe(E)を用いて、*in situ* hybridization 法を行った。その結果、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子は共に、小脳皮質の分子細胞層・プルキンエ細胞層・顆粒細胞層のいずれの層でも発現していた。

ML; 分子細胞層、PL; プルキンエ細胞層、GL; 顆粒細胞層



pA: PGK (mouse phosphoglycerate kinase-1) polyA signal sequence, Pr:PGK promoter sequence, TK: thymidine kinase gene, EGFP-pA: enhanced green fluorescent protein gene and BGH (bovine growth hormone) polyA signal sequence fusion sequence, NEO: neomycin resistance gene, \triangleright : loxP site, \rightarrow : primer position for genotyping by PCR, $-$: probe location for southern blotting

図 6 LRP1B 遺伝子欠失マウス作製方法

LRP1B 遺伝子のエクソン 1 付近のゲノム DNA 構造、ターゲティングベクター、相同組換え後の配列、サザンブロットのバンドサイズをそれぞれ示した。エクソン 1 にある翻訳開始コドン・シグナル配列・スプライシングドナー部位に、EGFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子が挿入されるようにターゲティングベクターを構築した。サザンハイブリダイゼーションによる相同組換え体のスクリーニングを行う際、野生型および相同組換え体で、BamHI 消化後に予測されるバンドのサイズを示した。

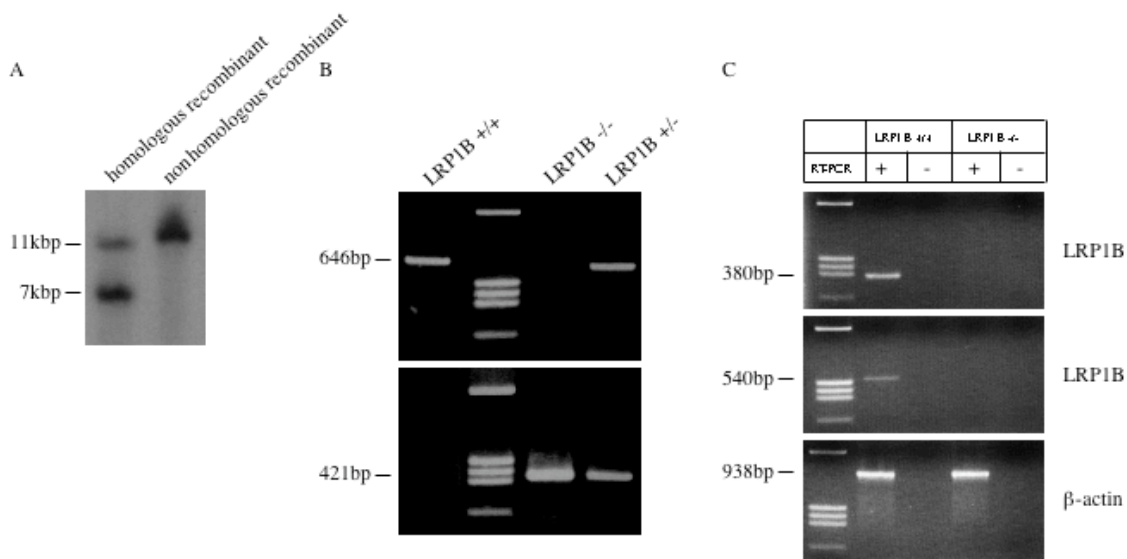


図 7 LRP1B 遺伝子欠失マウスの作製

A. ES 細胞の相同組換え体のスクリーニングを行うため、各 ES クローンからゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を BamHI で消化し、サザンハイブリダイゼーションを行った。プローブと予測されるバンドのサイズは、図 6 で示した。予想どおり相同組換え体は 11kbp と 7kbp に、非相同組換え体では 11kbp にバンドが見られた。

B. マウスの遺伝子型解析のために、野生型・ヘテロ欠失型・ホモ欠失型マウスの尾からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を wild-type allele (646bp) と disrupted allele (421bp) のそれぞれのバンドを検出できるプライマーセットを用いて、PCR によって増幅させた。予想どおり野生型は 646bp、ヘテロ欠失型は 646bp と 421bp、ホモ欠失型は 421bp にバンドを検出した。

C. LRP1B 遺伝子欠失マウスにおける LRP1B 遺伝子の発現を調べるため、野生型・ホモ欠失型マウスの脳から RNA を抽出した。RNA から cDNA を合成し、cDNA を LRP1B 遺伝子のイントロンを挟むように設計したプライマーセット (380bp と 540bp) を用いて PCR によって増幅させた。その際、ポジティブコントロールとして β -actin 遺伝子のイントロンを挟むように設計したプライマーセット (938bp) を用いた。予想どおり野生型マウスのみ 380bp と 540bp のバンドが見られた。

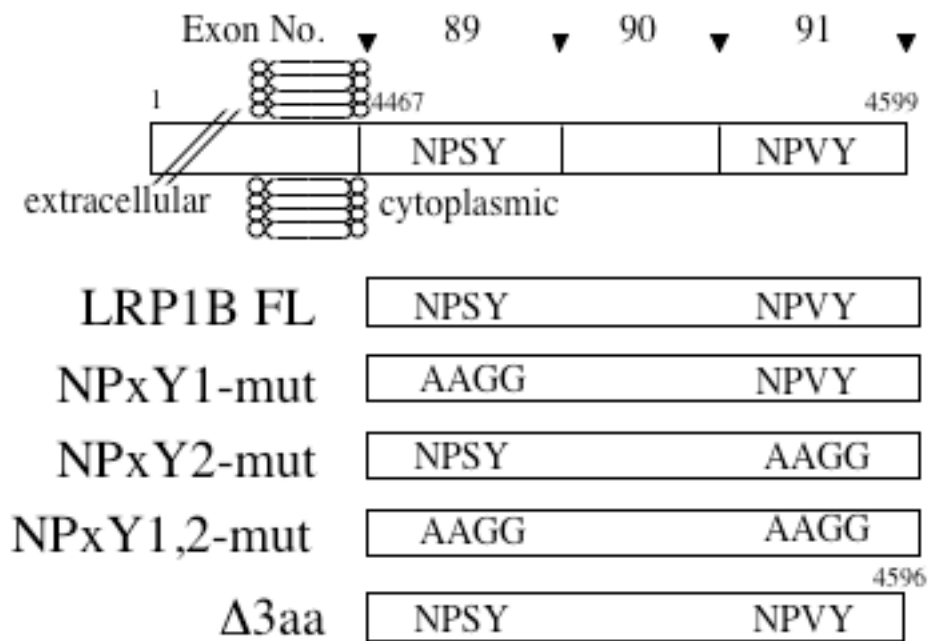


図 8 LRP1B 細胞内ドメインの野生型及び変異体構造

LRP1B 細胞内ドメインは、エクソン 89 から 91 により構成されている。LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの探索には LRP1B FL を用いて、yeast two-hybrid スクリーニングを行った。また、LRP1B 細胞内ドメインと結合タンパクとの結合領域の決定には、各種 LRP1B 細胞内ドメイン変異体を用いて、yeast two-hybrid アッセイを行った。

Gene	Clones	Independent	Expression	Function/Pathway
JIP-1b	12	10	ubiquitous	MAP kinase scaffold
PICK1	6	5	ubiquitous	endocytosis
RanBPM	4	4	placenta, heart, brain etc	Ras signaling
JIP-2	1	1	brain, testis	MAP kinase scaffold
Grb7	1	1	liver, kidney	cell migration
SNTG2	1	1	ubiquitous	dystrophin scaffold

表 1 LRP1B 細胞内ドメインと結合するタンパクの単離

Yeast two-hybrid スクリーニングにより単離した、LRP1B 細胞内ドメインに結合するタンパクの一覧を示した。同定したクローンには、シグナル伝達に関与するタンパクをコードする遺伝子も含まれていた。今回、解析した遺伝子を赤字で示した。

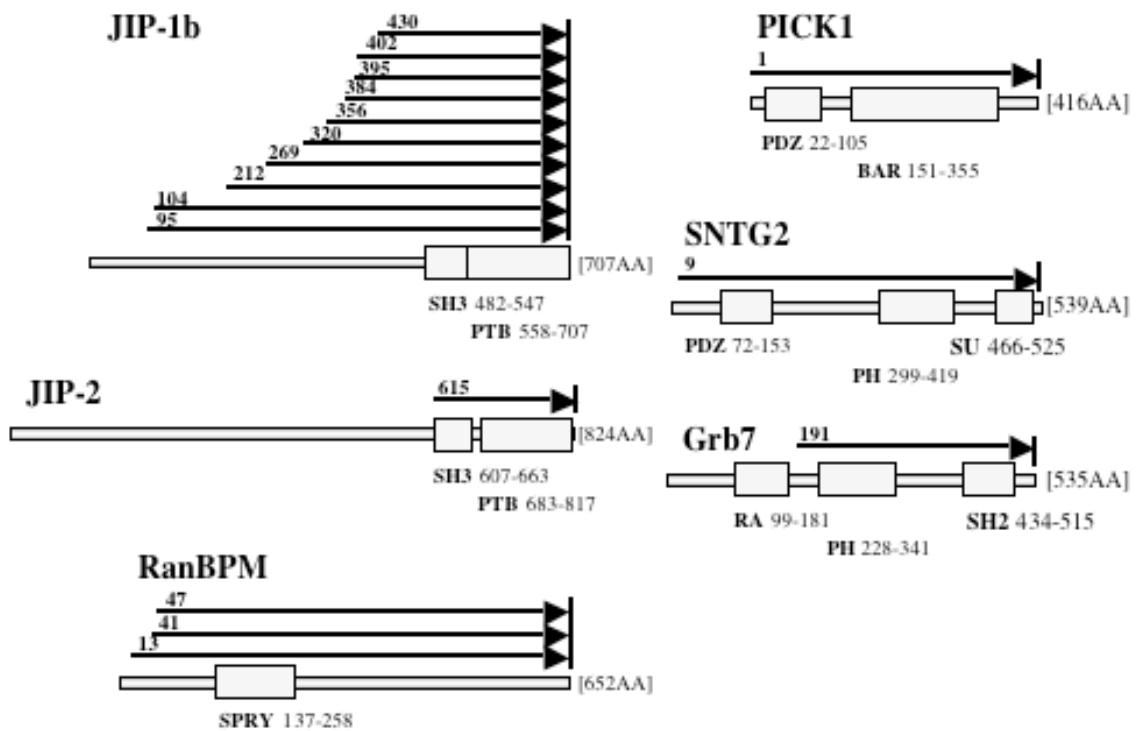


図9 yeast two-hybridスクリーニングで同定したLRP1Bの細胞内ドメインに結合するタンパクの構造

yeast two-hybridスクリーニングにより同定したLRP1Bの細胞内ドメインに結合するタンパクの構造を示した。各タンパクの持つドメインを四角形で示した。また数字と矢印は、同定したpreyベクターに含まれる挿入断片がコードする領域とアミノ酸を示している。


```

mLRP1B ICD    1 CKRKRRTKTIRRQPIINGGINVEIGNPSYNYEVDHSDGGLLEPSFMI 50
mLRP1 ICD     1 KRRVRGAKGFQHQRTNGAMNVEIGNPTYKMYEGGEPDDVGLLDADFAL 50
               . * * . * . . * . * * . * * * * * * . * * * * * * * . * .

mLRP1B ICD    51 DPVKSRYIGGGSSAFKLPHTAPPIYLNSDLKGPLTFGPTNYSNPVYAKLY 100
mLRP1 ICD     51 DPKK-----PTNFTNPVYATLY 67
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

mLRP1B ICD    101 MDGQNCRNSLASVDERKELLPKKIEIGIRETVA 133
mLRP1 ICD     68 MGGHGSRHSLASTDEKRELLGRGPEDEIGDPLA 100
               * * . . * . * * * * * * . * * * * * * . * * . . *

```

図 10 LRP1B と LRP1 細胞内ドメインのホモロジー

cDNA から予想されるマウス LRP1B と LRP1 の細胞内ドメインのアミノ酸配列をそれぞれ示した。NPxY モチーフは灰色、YXXL モチーフは白色、ジロイシンモチーフは☆でそれぞれ示した。挿入部分を除いた LRP1B 細胞内ドメインは、LRP1 の細胞内ドメインと、同一性で 50%、相同性で 64%の類似性を示す。

prey \ bait	LRP1B ex89-91	LRP1B ex89,91	LRP1
JIP-1b	+++	-	+++
PICK1	+++	+++	+++
RanBPM	+++	++	+++
JIP-2	+	-	+++
Grb7	+++	++	-
SNTG2	+++	-	-

表2 LRP1B細胞内ドメイン結合タンパクと、LRP1B細胞内ドメインの選択的スプライシングアイソフォーム或いはLRP1細胞内ドメインとの結合確認

Yeast two-hybrid結合アッセイにより、LRP1B細胞内ドメイン結合タンパクと、LRP1Bエクソン89と91からなるスプライシングアイソフォーム或いはLRP1細胞内ドメイン全長との結合を調べた。GAL4-DBDに融合したLRP1B細胞内ドメインのスプライシングアイソフォーム或いはLRP1細胞内ドメインと、GAL4-ADに融合したLRP1B細胞内ドメイン結合タンパクを酵母株SFY526に導入し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。+++、++、+、-は、強い結合から結合しないものを表している。

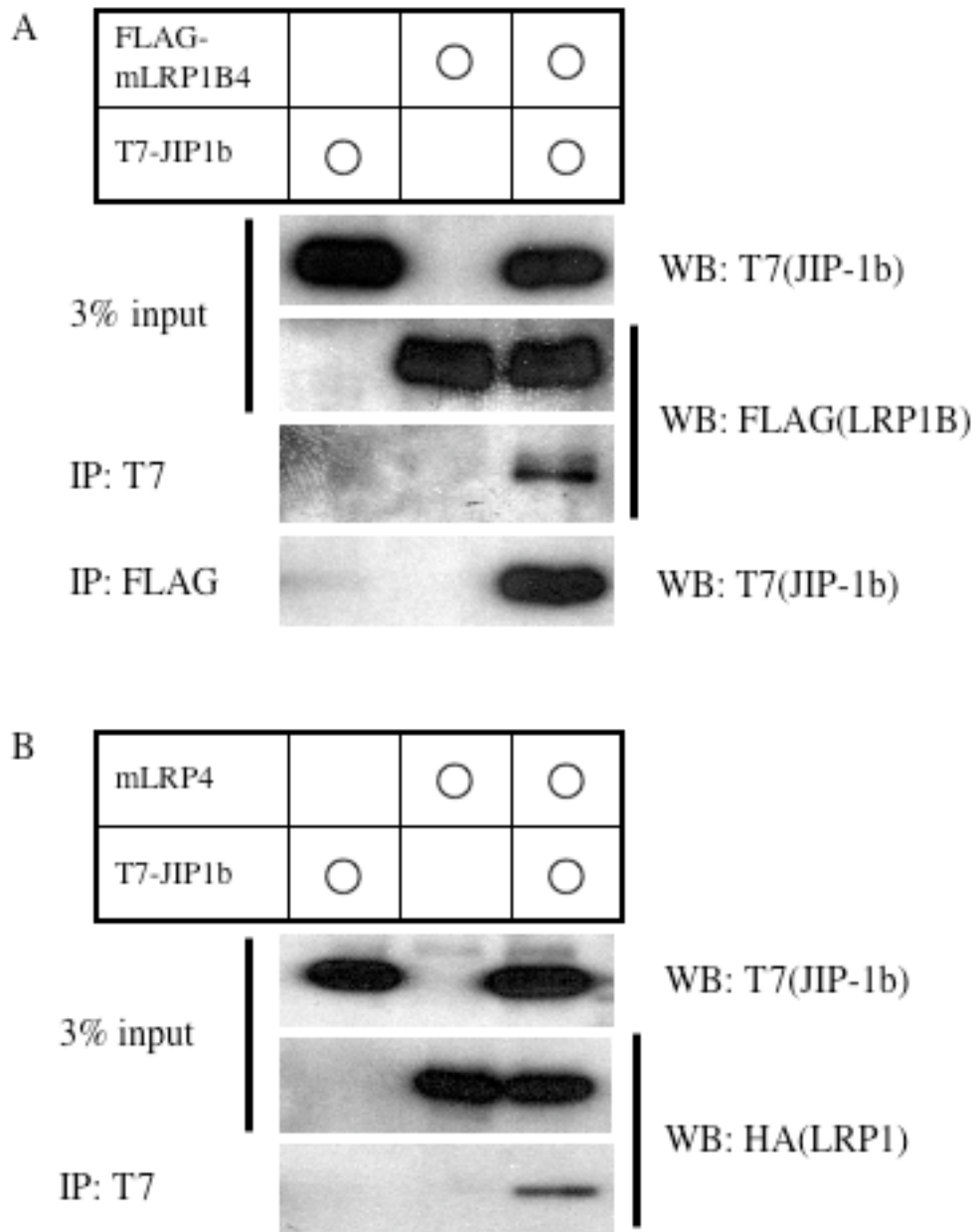


図11 LRP1BはJIP1bと結合する

FLAG-mLRP1B4或いはmLRP4とT7-JIP1b発現ベクターをHEK293T細胞に導入し、48-72時間後細胞を回収した。細胞抽出液を抗T7抗体或は抗FLAG抗体で免疫沈降し、沈降物を各抗体でウエスタンブロットを行った。Inputは免疫沈降に用いた抽出物のうち3%を用いて、抗T7抗体、抗FLAG抗体、抗HA抗体でウエスタンブロットを行った。

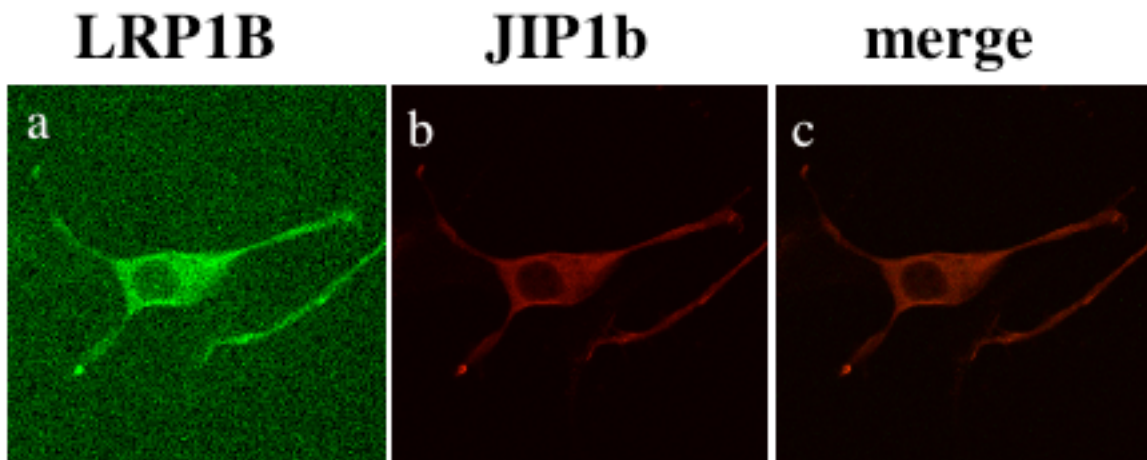


図12 LRP1BとJIP1bは共局在する

FLAG-mLRP1B4とmyc-JIP1b発現ベクターをN1E115細胞に導入した。48時間後、抗LRP1B抗体(a),もしくは抗myc抗体(9E10)(b)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(c)はLRP1BとJIP1bの染色像を重ね合わせたものを示している。

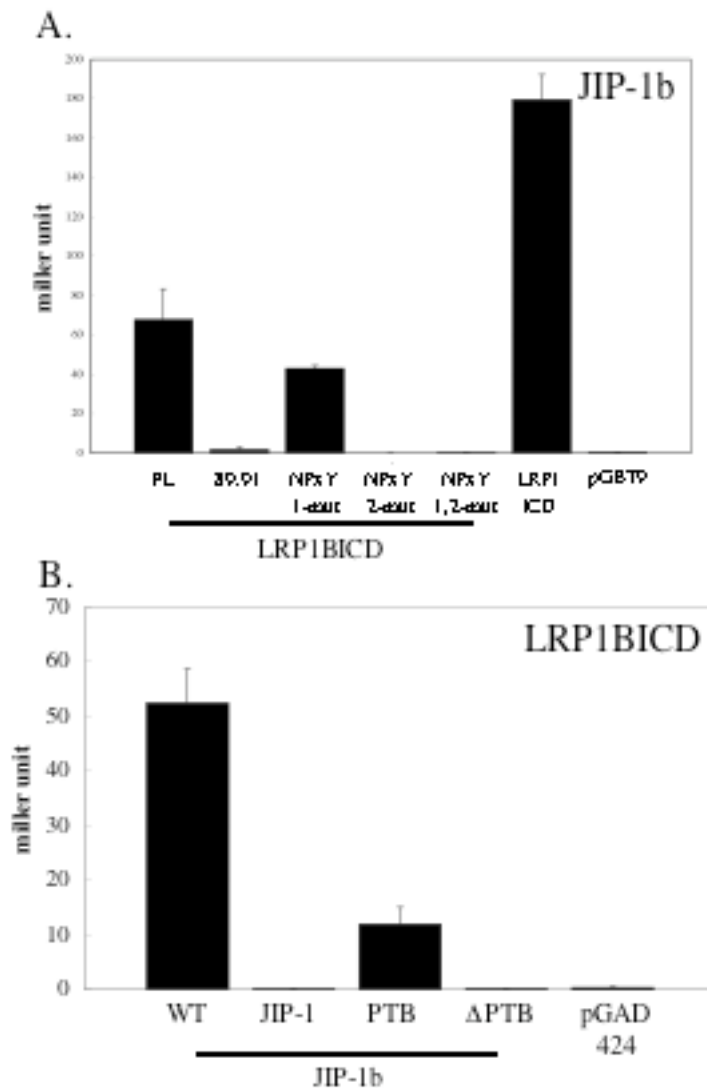




図13 LRP1Bエクソン91内にあるNPxYモチーフとJIP-1bのPTBドメインが結合する

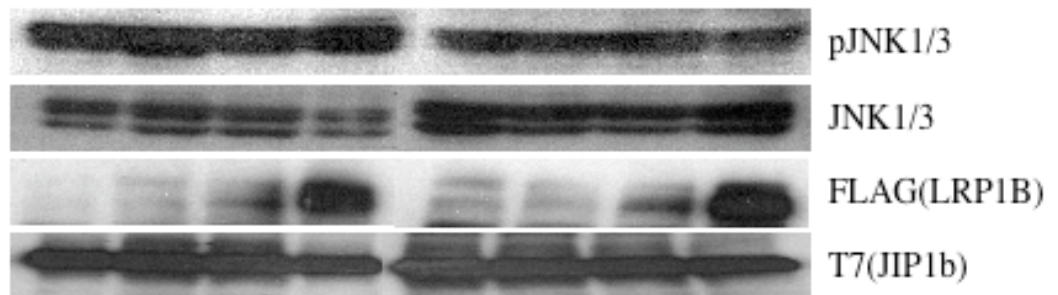
Yeast two-hybrid結合アッセイにより、LRP1BとJIP-1bの結合領域を調べた。

A, JIP-1bとLRP1Bの細胞内ドメイン全長(FL), エクソン89と91から構成されるスプライシングアイソフォーム(89, 91), エクソン89のNPxYモチーフ変異体(NPxY1-mut), エクソン91のNPxYモチーフ変異体(NPxY2-mut), エクソン89と91の両NPxYモチーフ変異体(NPxY1, 2-mut)との結合を調べた。

B, LRP1B細胞内ドメイン全長とJIP-1b(WT), スプライシングアイソフォームであるJIP-1, JIP-1bのPTBドメイン(PTB), JIP-1bのSH3ドメイン(ΔPTB)との結合を調べた。

A.

UV	○	○	○	○				
His•S-JNK	○	○	○	○	○	○	○	○
T7-JIP1b	○	○	○	○	○	○	○	○
FLAG-mLRP1B4								



B.

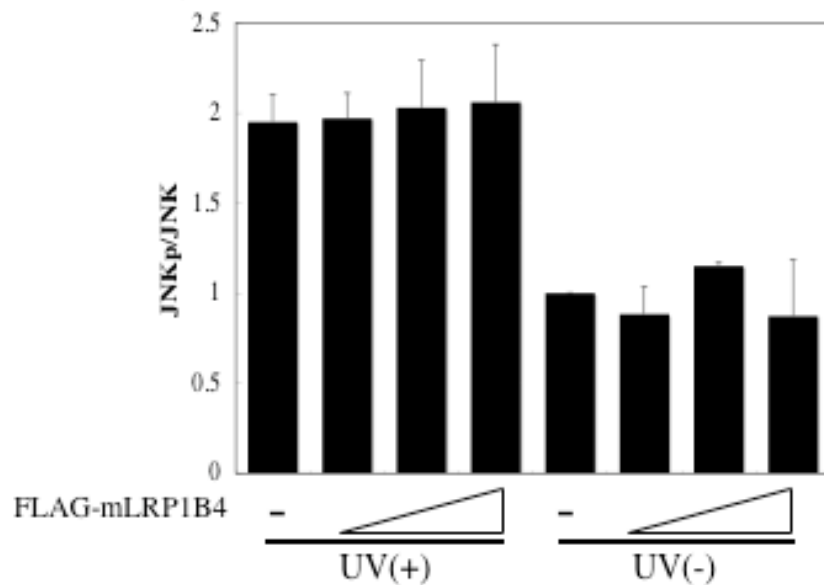




図14 LRP1BはJNK経路に影響しない

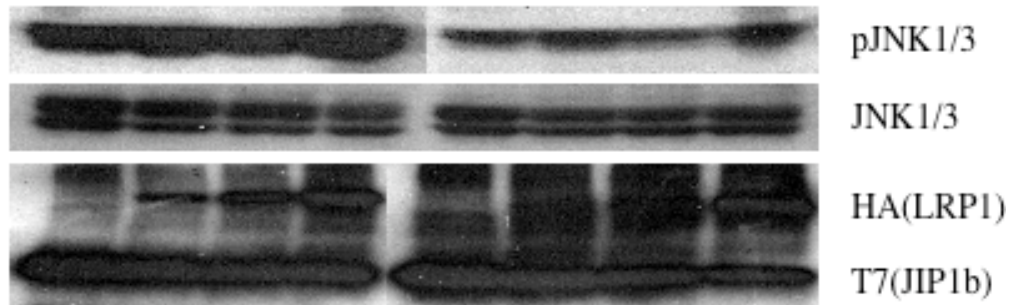
段階的に量を増加したFLAG-mLRP1B4 (0-900ng) を、800ngのHis•S-JNK1と1000ngの T7-JIP1b発現ベクターとともにHEK293T細胞に導入した。48時間後に80J/m²のUV照射を施し、1時間後に細胞を回収した。

A, 各抗体でウエスタンブロットを行った。

B, Aの結果から、リン酸化されたJNKの割合を示した。UV照射なしのFLAG-mLRP1B4を加えない場合にリン酸化されたJNKの割合を1とした。

A.

UV	○	○	○	○				
HA-JNK1	○	○	○	○	○	○	○	○
T7-JIP1b	○	○	○	○	○	○	○	○
mLRP4								



B.

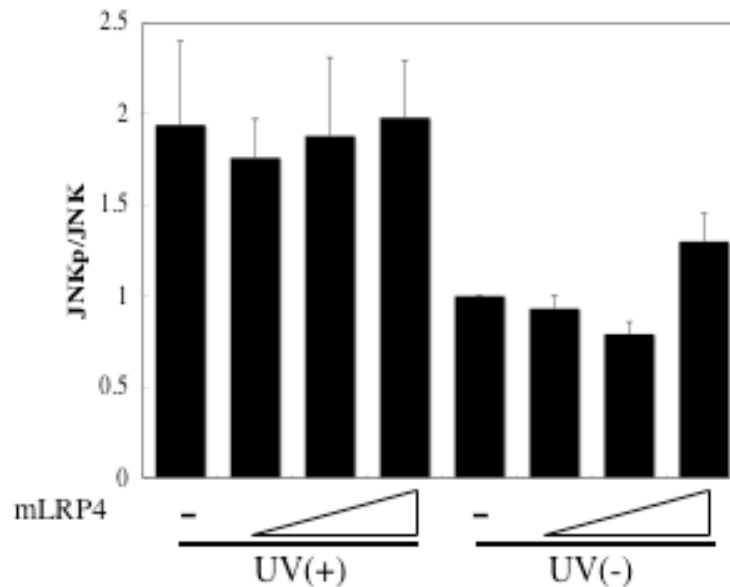


図15 LRP1はJNK経路に影響しない

段階的に量を増加したmLRP4 (0-900ng) を、800ngのHis•S-JNK1と1000ngのT7-JIP1b発現ベクターとともにHEK293T細胞に導入した。48時間後に80J/m²のUV照射を施し、1時間後に細胞を回収した。

A, 各抗体でウエスタンブロットを行った。

B, Aの結果から、リン酸化されたJNKの割合を示した。UV照射なしのmLRP4を加えない場合にリン酸化されたJNKの割合を1とした。

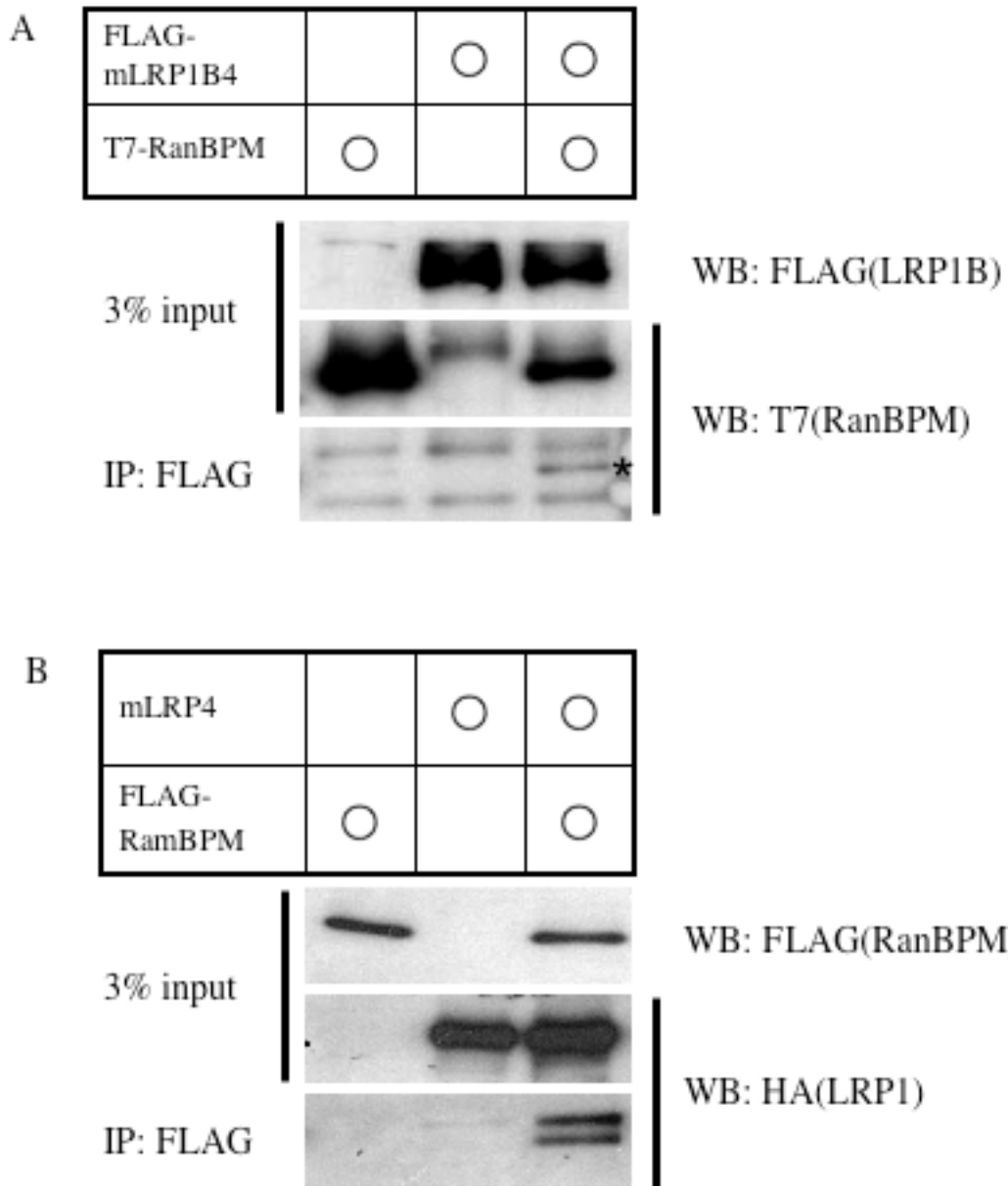


図16 LRP1BはRanBPMと結合する

FLAG-mLRP1B4或いはmLRP4とT7-RanBPM或いはFLAG-RanBPM発現ベクターをHEK293T細胞に導入し、48-72時間後細胞を回収した。細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降し、沈降物を抗T7抗体或いは抗HA抗体各抗体でウエスタンブロットを行った。Inputは免疫沈降に用いた抽出物のうち3%を用いて、各抗体でウエスタンブロットを行った。

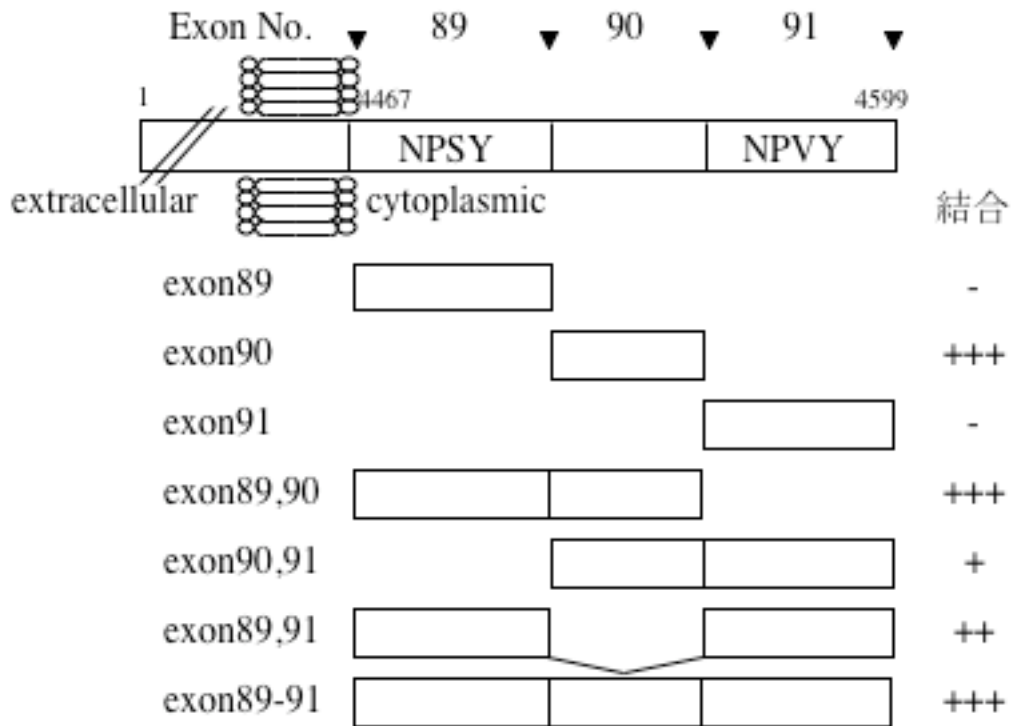


図17 RanBPMはLRP1B細胞内ドメインの特定配列を認識して結合しない
 Yeast two-hybrid結合アッセイにより、RanBPMと結合するLRP1Bの領域を決めた。
 RanBPMとLRP1B細胞内ドメインの各エクソン(exon89, exon90, exon91)、エクソ
 ン89と90の組み合わせ(exon89, 90)、エクソン90と91の組み合わせ(exon90, 91)、
 LRP1B細胞内ドメインのエクソン89と91からなるスプライシングアイソフォー
 ム(exon89, 91)、LRP1B細胞内ドメインの全長(exon89-91)との結合を調べた。+++,
 ++, +, -は、強い結合から結合しないものを表している。

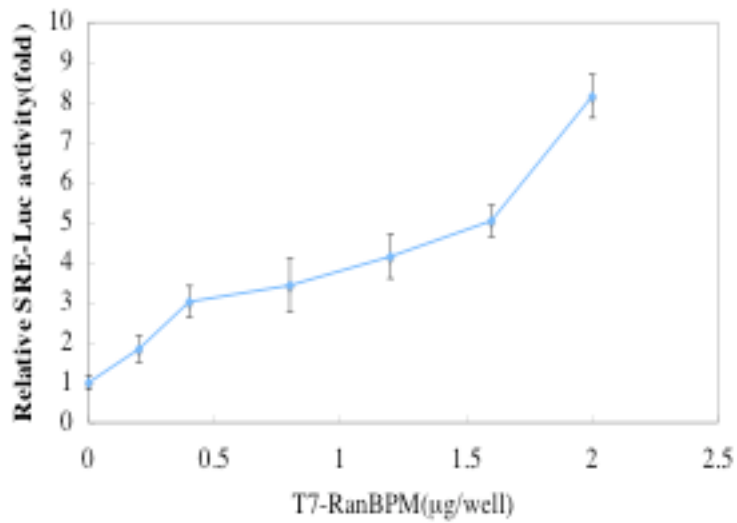


図18 COS7細胞において、RanBPM dose-dependentにSRE配列による転写活性が起こる

段階的に量を増加したT7-RanBPM発現ベクター(0-2000ng)を、400ngのpSRE-LucベクターとともにCOS7細胞に導入した。48時間後に無血清状態に移行させ、さらに12時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率を調べるために、167ngのpME18s-LacZベクターも同時にトランスフェクションした。T7-RanBPMを加えない場合のルシフェラーゼ活性値を1とし、活性を測定した。

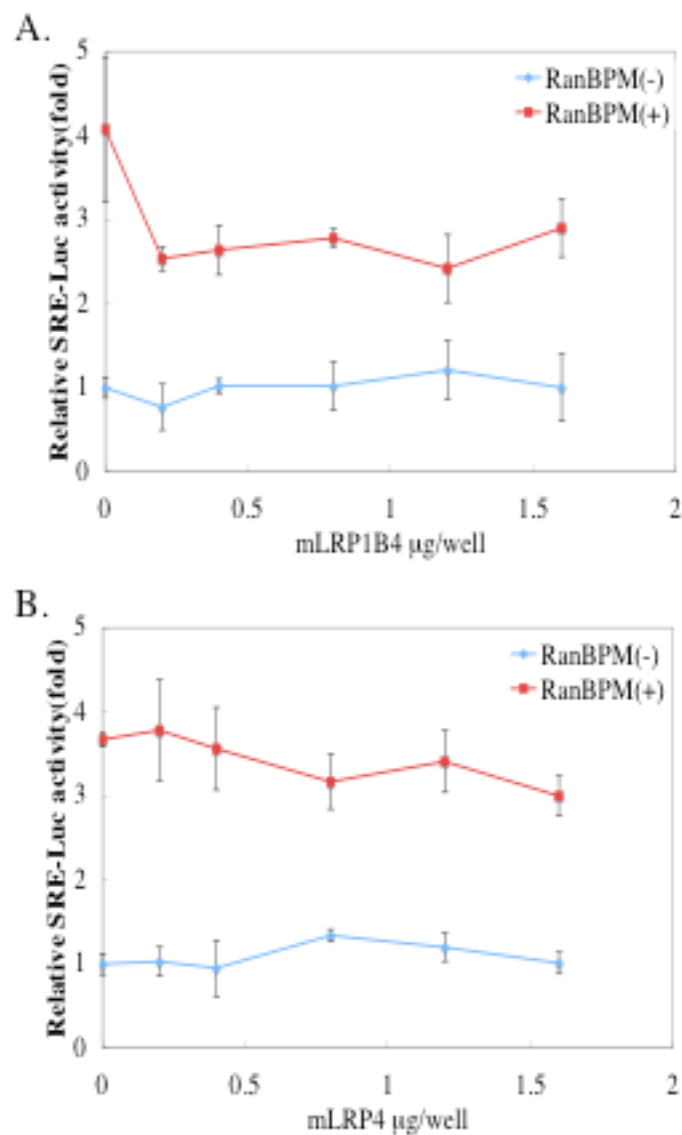


図19 LRP1BとLRP1は、COS7細胞におけるRanBPM依存のSRE配列による転写活性に影響しない

段階的に量を増加したFLAG-mLRP1B4 (A),或いはmLRP4 (B) (各0-1600ng) を400ngのT7-RanBPM発現ベクターと、400ngのpSRE-LucベクターとともにCOS7細胞に導入した。48時間後に無血清状態に移行させ、さらに12時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率を調べるために、167ngのpME18s-LacZベクターも同時にトランスフェクションした。FLAG-mLRP1B4或いはmLRP4とT7-RanBPMを加えない場合のルシフェラーゼ活性値を1とし、活性を測定した。

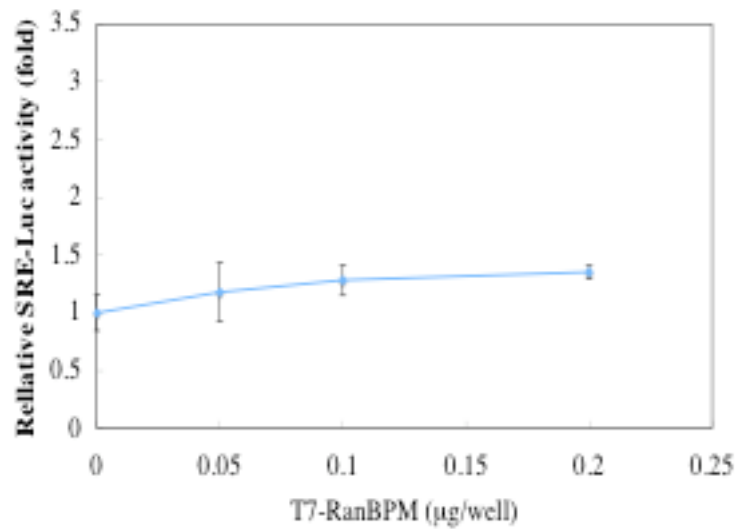


図20 HEK293T細胞において、RanBPM 依存的なSRE配列による転写活性が起こらない

段階的に量を増加したT7-RanBPM発現ベクター(0-200ng)を、100ngのpSRE-LucベクターとともにHEK293T細胞に導入した。48時間後に無血清状態に移行させ、さらに12時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率を調べるために、20ngのpCMV-LacZベクターも同時にトランスフェクションした。T7-RanBPMを加えない場合のルシフェラーゼ活性値を1とし、活性を測定した。

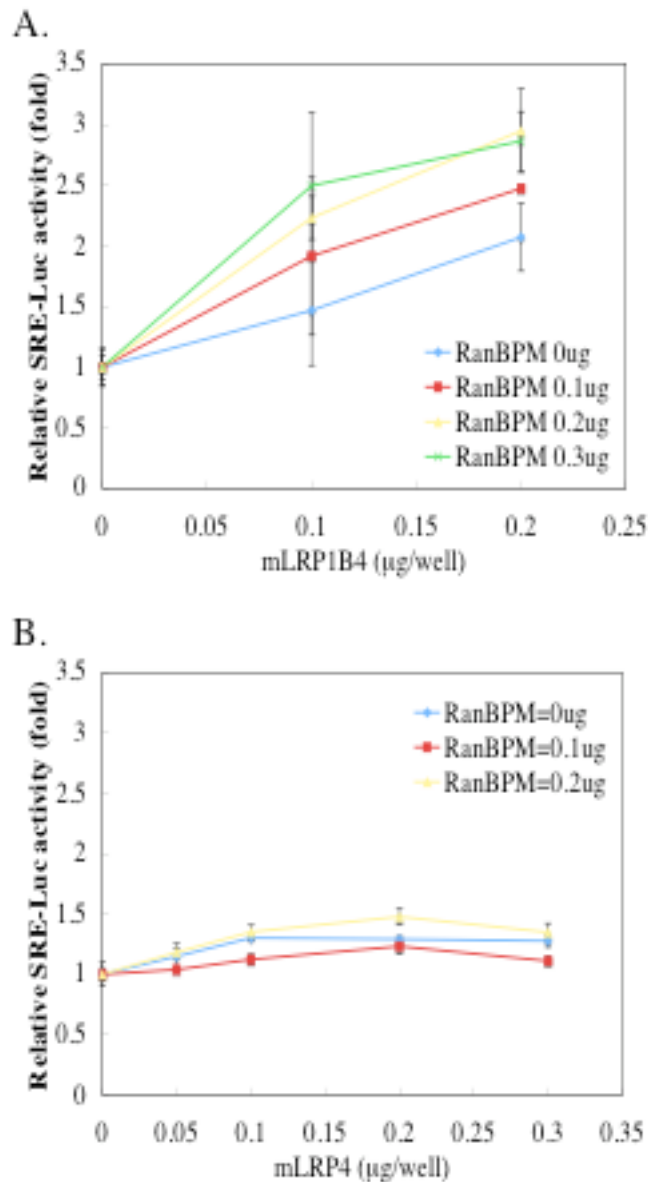


図21 HEK293T細胞において、LRP1B依存的なSRE配列による転写活性が生じる

段階的に量を増加したFLAG-mLRP1B4 (0-200ng) (A)或いはmLRP4 (0-300ng) (B)をT7-RanBPM (0-300ng, A)(0-200ng, B)発現ベクター、100ngのpSRE-LucベクターとともにHEK293T細胞に導入した。48時間後に無血清状態に移行させ、さらに12時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率を調べるために、20ngのpCMV-LacZベクターも同時にトランスフェクションした。FLAG-mLRP1B4或いはmLRP4とT7-RanBPMを加えない場合のルシフェラーゼ活性値を1とし、活性を測定した。

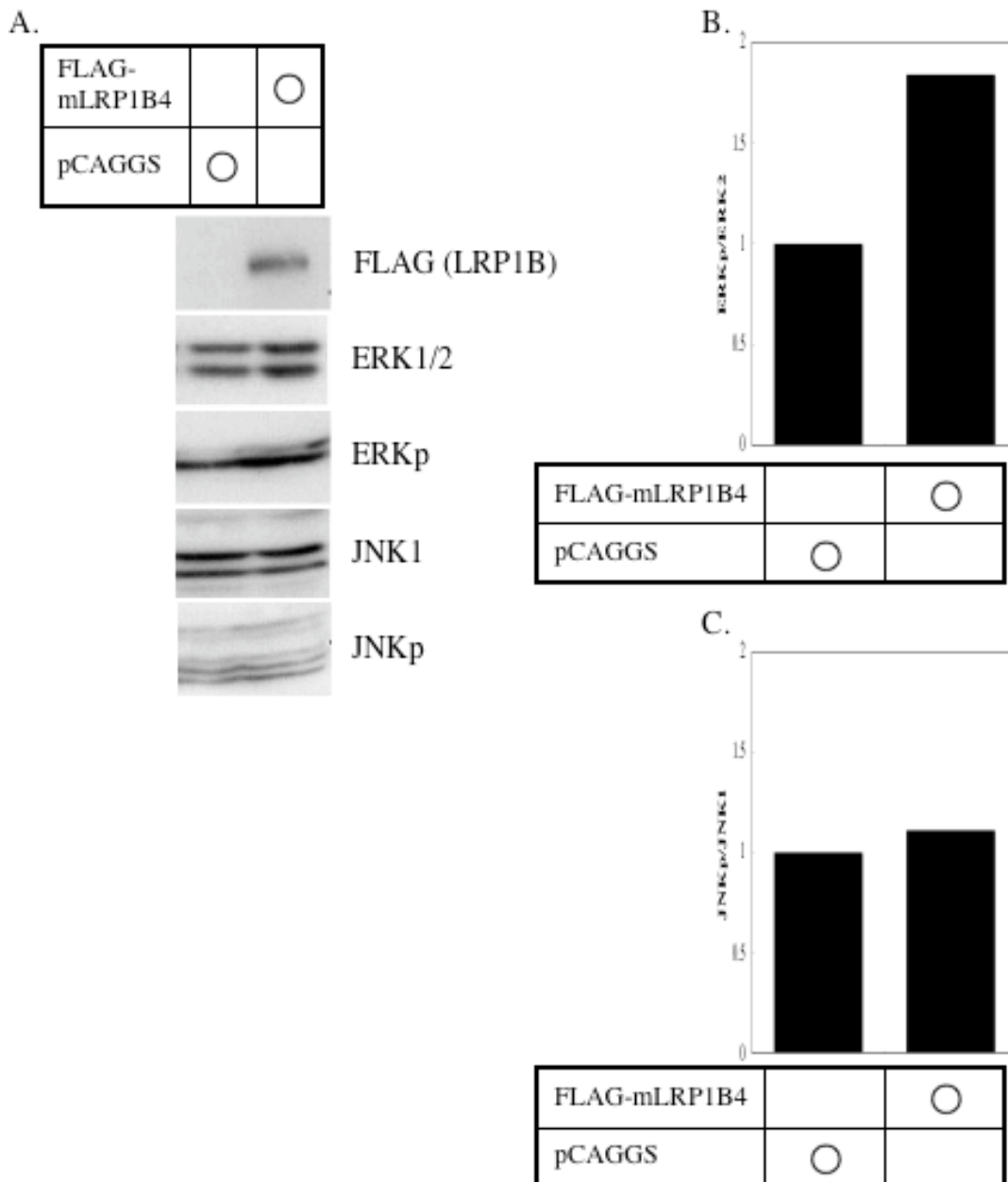


図22 HEK293T細胞で、LRP1BはERKシグナル経路の活性に影響する
1500ngのFLAG-mLRP1B4或いはpCAGGSをHEK293T細胞に導入し、48時間後に無血清状態に移行させ、さらに12時間後に細胞を回収した。

A, 各抗体でウエスタンブロットを行った。

B, Aの結果から、リン酸化されたERKの割合を示した。FLAG-mLRP1B4を加えない場合のリン酸化されたERKの割合を1とした。

C, Aの結果から、リン酸化されたJNKの割合を示した。FLAG-mLRP1B4を加えずにリン酸化されたJNK1の割合を1とした。

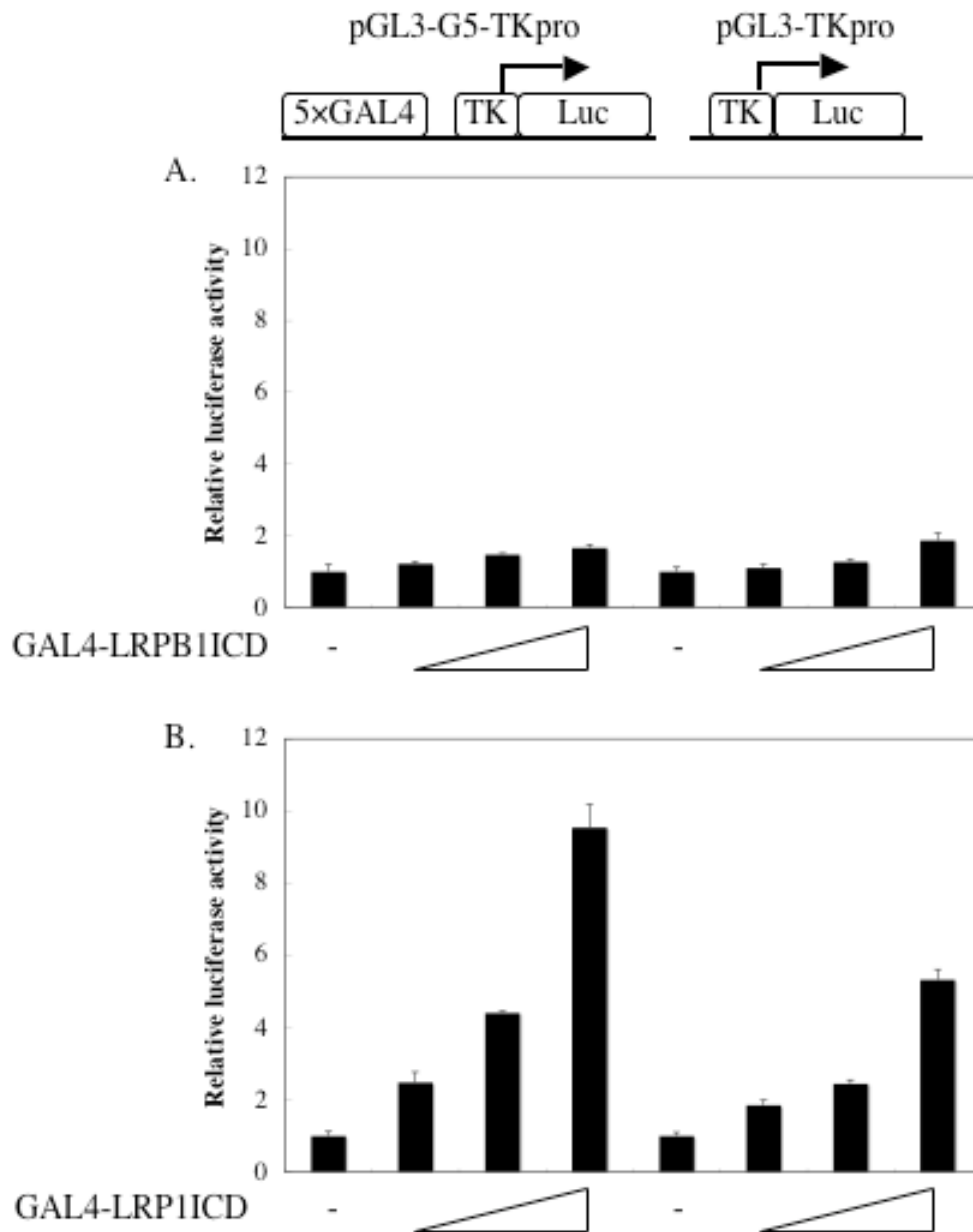


図23 LRP1BとLRP1細胞内ドメインはDNA結合依存的転写を調節しない
 段階的に量を増加したGAL4-LRP1BICD(A)或いはGAL4-LRP1ICD(B)発現ベクター(0-200ng)を、100ngのGAL4結合サイトを5つ含むpGL3-G5-TK或いはpGL-TKベクターとともにHEK293T細胞に導入し、48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率を調べるために、20ngのpCMV-LacZベクターも同時にトランスフェクションした。 GAL4-LRP1BICD 或いは GAL4-LRP1ICDを加えない場合のルシフェラーゼ活性値を1とし、活性を測定した。

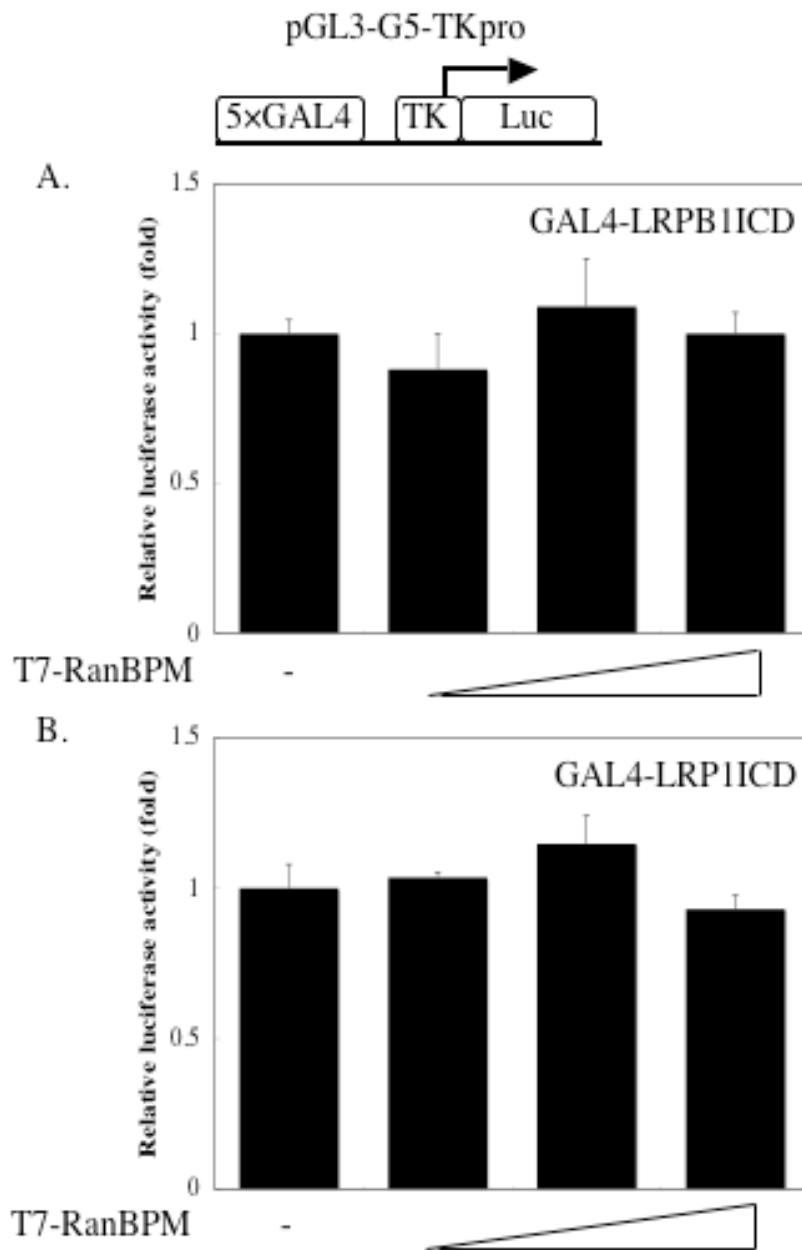


図24 RanBPMは、LRP1BとLRP1両細胞内ドメインの転写のアクチベーターとして機能しない

段階的に量を増加した T7-RanBPM 発現ベクター (0-200ng) を 100ng の GAL4-LRP1BICD 或いは GAL4-LRP1ICD 発現ベクターと、100ng の GAL4 結合サイトを 5 つ含む pGL3-G5-TK ベクターとともに HEK293T 細胞に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率を調べるために、20ng の pCMV-LacZ ベクターも同時にトランスフェクションした。 T7-RanBPM を加えない場合のルシフェラーゼ活性値を 1 とし、活性を測定した。

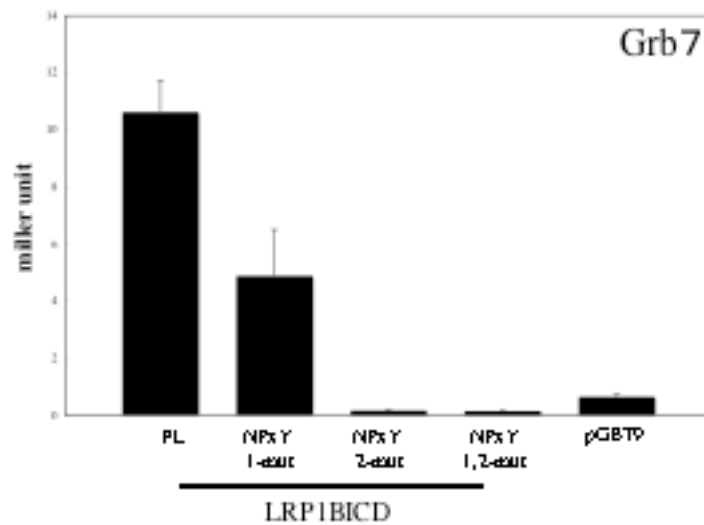


図25 Grb7はLRP1Bエクソン91のNPxYモチーフ変異体と結合しない
 Yeast two-hybrid結合アッセイにより、Grb7と結合するLRP1Bの領域を決めた。Grb7とLRP1B細胞内ドメイン全長(FL),エクソン89のNPxYモチーフ変異体(NPxY1-mut), エクソン91のNPxYモチーフ変異体(NPxY2-mut), エクソン89と91の両NPxYモチーフ変異体(NPxY1, 2-mut)との結合を調べた。

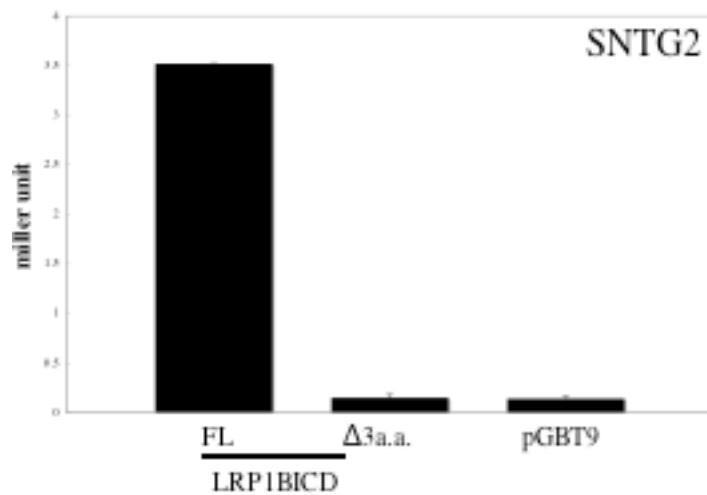


図26 SNTG2はLRP1BC末端3アミノ酸残基と結合する
 Yeast two-hybrid結合アッセイにより、SNTG2と結合するLRP1Bの領域を決めた。SNTG2とLRP1B細胞内ドメイン全長(FL), C末端3アミノ酸残基欠失体(Δ3aa)との結合を調べた。

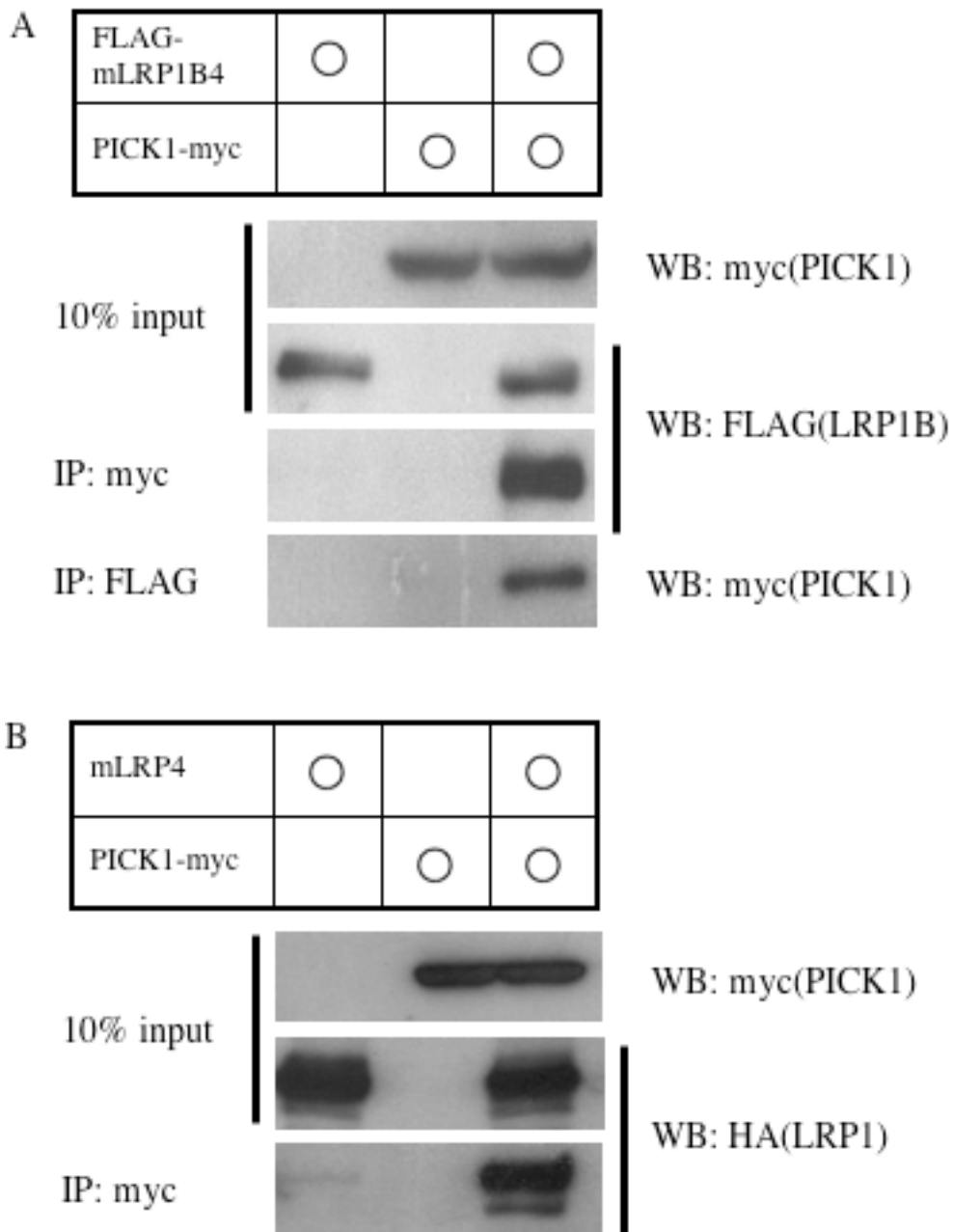


図27 LRP1BはPICK1と結合する

FLAG-mLRP1B4或いはmLRP4とPICK1-myc発現ベクターをHEK293T細胞に導入し、48-72時間後細胞を回収した。細胞抽出液を抗myc抗体あるいは抗FLAG抗体で免疫沈降し、沈降物を各抗体でウエスタンブロットを行った。Inputは免疫沈降に用いた抽出物のうち10%を用いて、抗myc抗体、抗FLAG抗体、抗HA抗体でウエスタンブロットを行った。

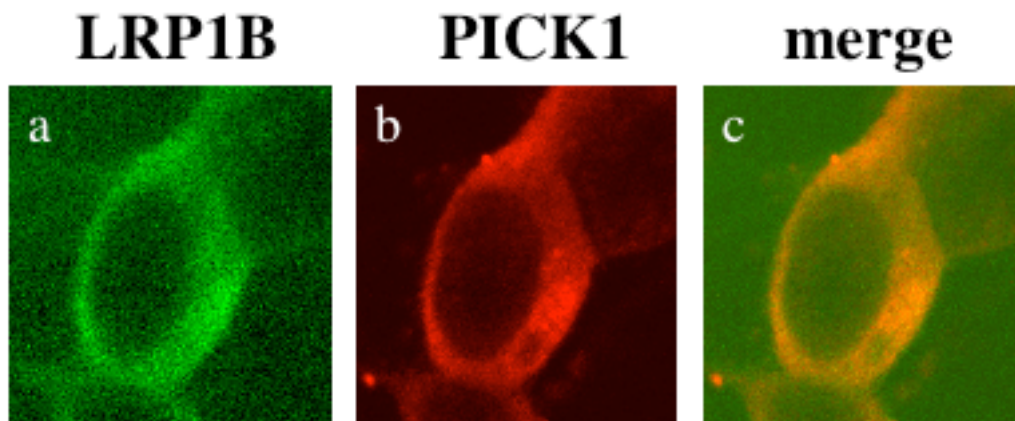


図28 LRP1BとPICK1は共局在する

FLAG-mLRP1B4とPICK1-myc発現ベクターをN1E115細胞に導入した。48時間後、抗LRP1B抗体 (a)もしくは抗myc抗体(9E10) (b)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(c)はLRP1BとPICK1の染色像を重ね合わせたものを示している。

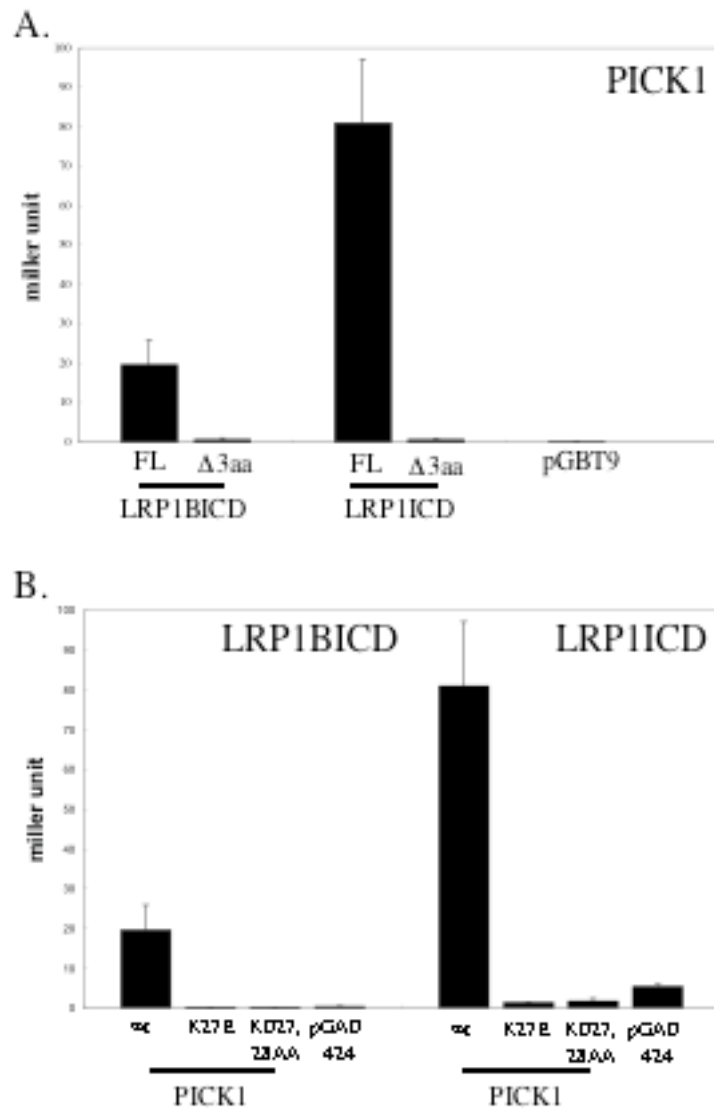


図29 LRP1BC末端3アミノ酸残基とPICK1のPDZドメインが結合する
Yeast two-hybrid結合アッセイにより、LRP1B或いはLRP1とPICK1の結合領域を決めた。

A, PICK1とLRP1B細胞内ドメイン全長(FL), C末端3アミノ酸残基欠失体($\Delta 3aa$) (left)、PICK1とLRP1細胞内ドメイン全長(FL), C末端3アミノ酸残基欠失体($\Delta 3aa$) (middle)との結合を調べた。

B, LRP1B細胞内ドメイン全長とPICK1(WT), PDZドメイン内K27E変異体(K27E), PDZドメイン内K27AとD28A変異体(KD27,28AA)との結合を調べた(left) 。 LRP1細胞内ドメイン全長とPICK1(WT), PDZドメイン内K27E変異体(K27E), PDZドメイン内K27AとD28A変異体(KD27,28AA)との結合を調べた(right) 。

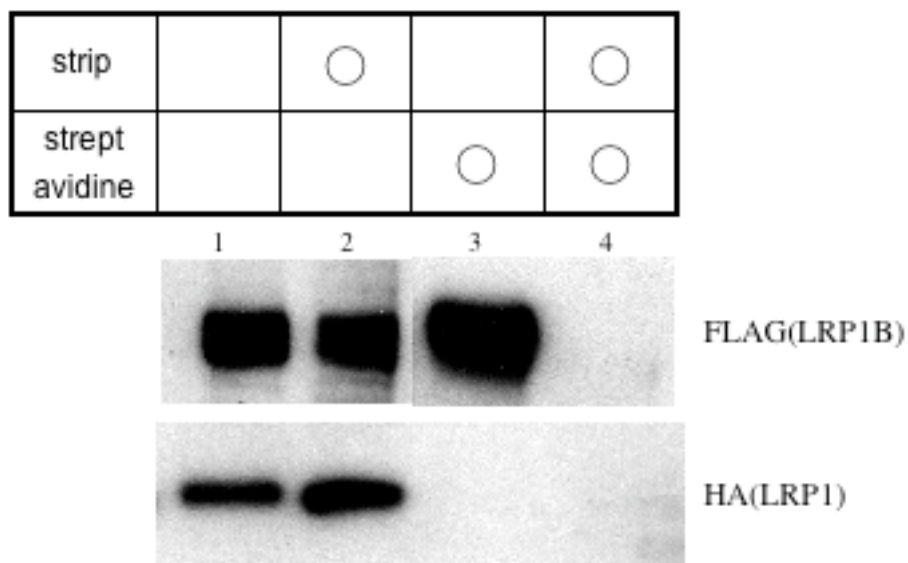


図30 ビオチン標識の内在化アッセイはLRP1Bに有用である

3000ngのFLAG-mLRP1B4 (上段)或いはmLRP4 (下段) をHEK293T細胞に導入し、48時間後細胞を回収し、それぞれ示した条件下で内在化のアッセイを行った。そして、抗FLAG抗体(上段)或いは抗HA抗体(下段)でウェスタンブロットを行った。

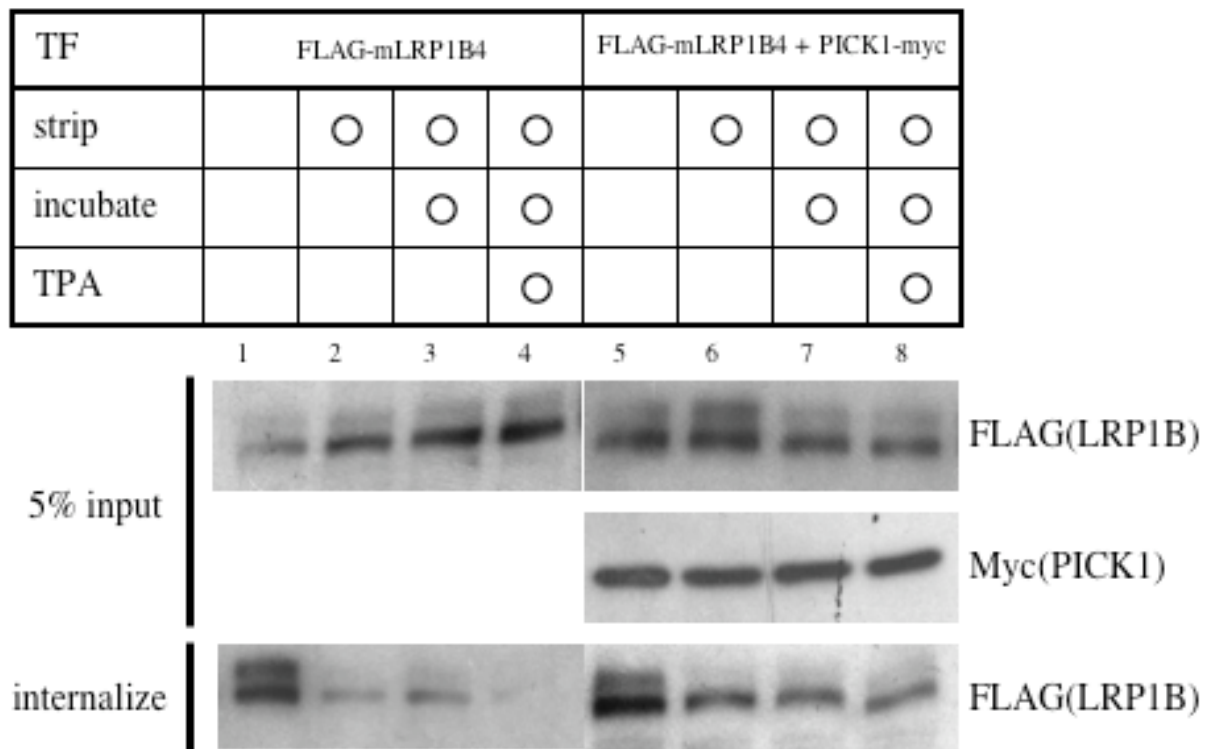


図31 LRP1Bの内在化はPKCの活性化により阻害、PICK1存在下で促進される

1500ngのFLAG-mLRP1B4と1500ngのPICK1-myc 或いは mockベクターをHEK293T細胞に導入し、48時間後、それぞれ示した条件下で内在化のアッセイを行った。そして、抗FLAG抗体でウエスタンブロットを行った。Inputは内在化のアッセイに用いた抽出物のうち5%を用いて、抗FLAG抗体、抗myc抗体でウエスタンブロットを行った。

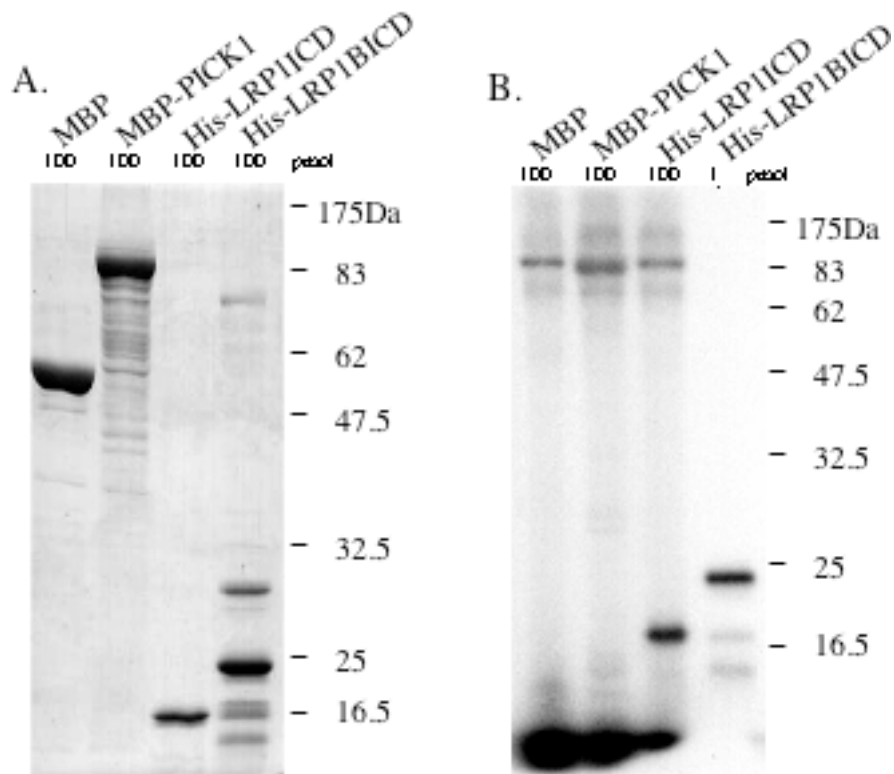


図32 PICK1, LRP1細胞内ドメイン, LRP1B細胞内ドメインは*in vitro*でPKC α によりリン酸化される

A, 大腸菌で発現させ、精製したMBP, MBP-PICK1, His-LRP1ICD, His-LRP1BICDを各レーン100 pmol使用してSDS-PAGEを行い、Coomassie brilliant blue (CBB)染色した。

B, 100 pmol のMBP, MBP-PICK1, His-LRP1ICD, His-LRP1BICDをPKC α , γ 32 P-ATPと共に 30 °Cで10分間反応した。記載量のMBP, MBP-PICK1, His-LRP1ICD, His-LRP1BICDでSDS -PAGEを行い、オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。

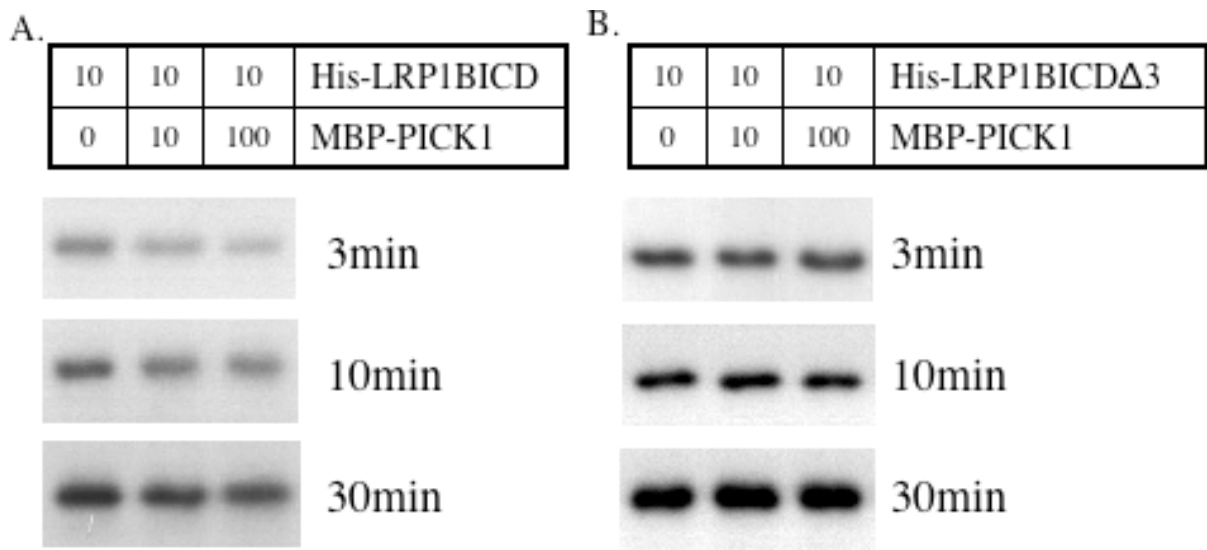


図33 PICK1 は、*in vitro*でのPKC α によるLRP1B細胞内ドメインのリン酸化を阻害する

10 pmolのHis-LRP1BICD (A)或いはHis-LRP1BICD Δ 3aa (B) を、0, 10, 100pmolのMBP-PICK1と4°Cで3時間反応させ、結合を促した。その反応液を PKC α , γ 32 P-ATPと共に30 °Cで3・10・30分間反応させた後、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。

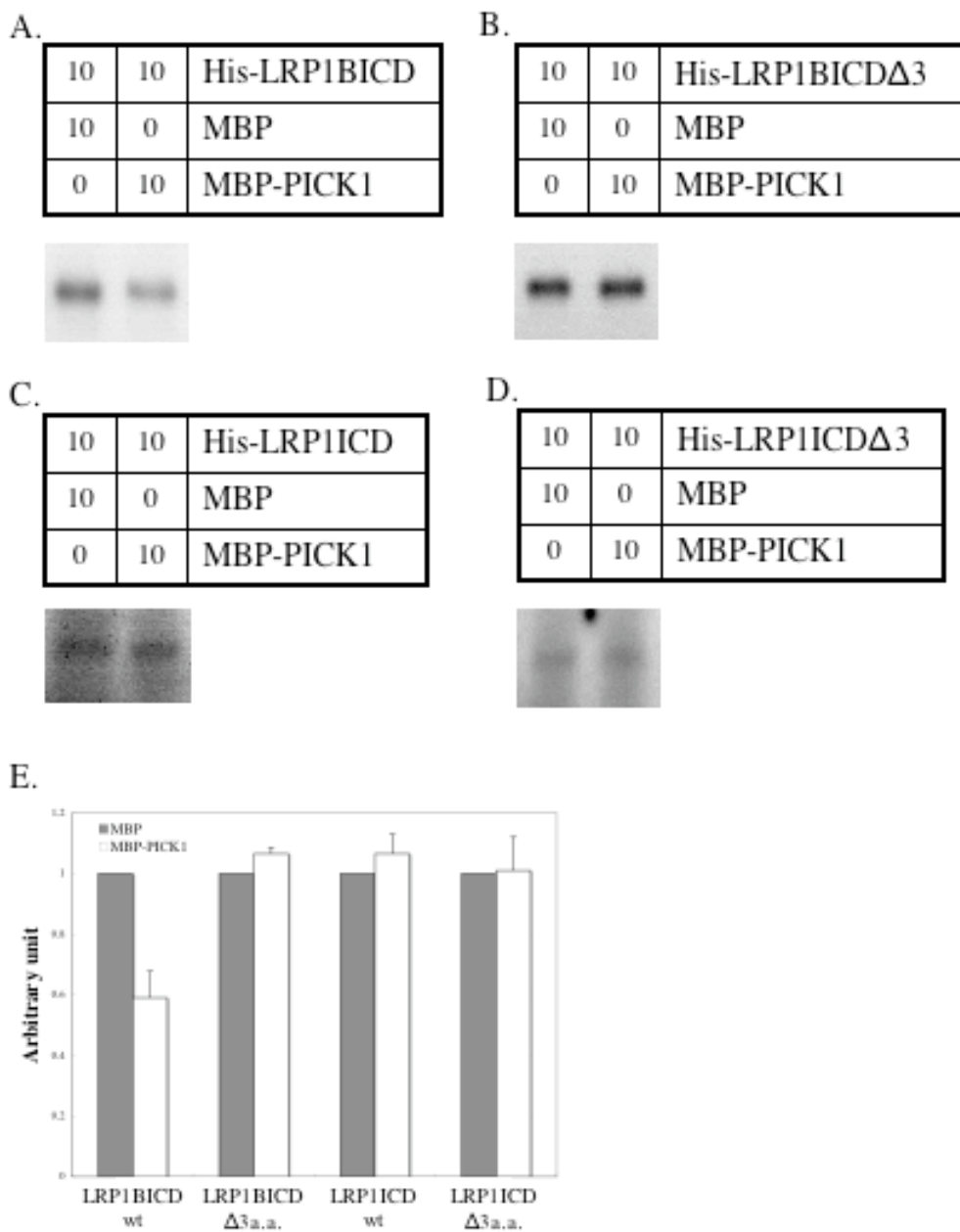
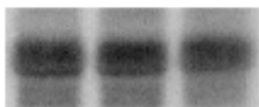


図34 PICK1とLRP1Bの結合は、*in vitro*でのPKC α によるLRP1B細胞内ドメインのリン酸化を阻害するが、PICK1とLRP1の結合は、LRP1細胞内ドメインのリン酸化に影響しない

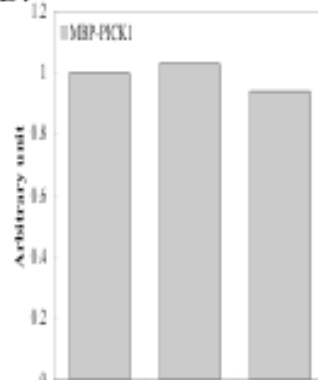
10 pmolのHis-LRP1BICD (A), His-LRP1BICD Δ 3aa (B), His-LRP1ICD (C)或いはHis-LRP1ICD Δ 3aa (D)を、10pmolのMBP或いはMBP-PICK1と4°Cで3時間反応させ、結合を促した。その反応液をPKC α 、 γ - 32 P-ATPと共に30°Cで10分間反応させた後、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。E, A-Dの結果を表にまとめた。

A.

0	100	0	His-LRP1BICD
0	0	100	His-LRP1ICD
100	100	100	MBP-PICK1



B.



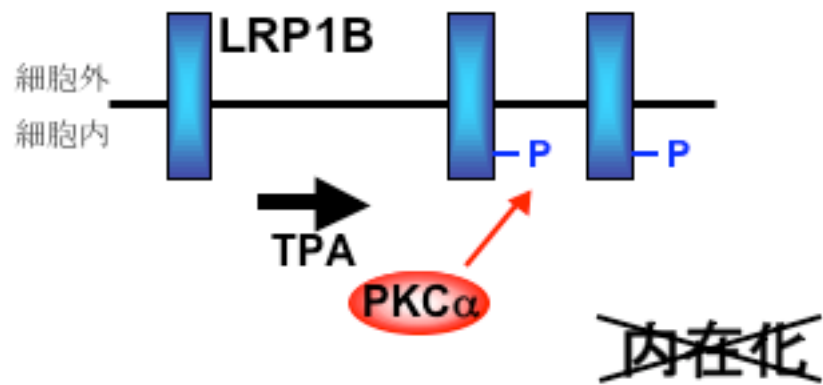
0	100	0	His-LRP1BICD
0	0	100	His-LRP1ICD
100	100	100	MBP-PICK1

図35 LRP1B細胞内ドメインやLRP1細胞内ドメインは、*in vitro*でのPKC α によるPICK1のリン酸化を阻害しない

A, 100 pmolのMBP-PICK1とHis-LRP1BICD或いは His-LRP1ICDを4°Cで3時間反応させ、結合を促した。その反応液を PKC α や γ ^{32}P -ATPと共に 30 °Cで10分間反応させた後、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィによりシグナルを検出した。

B, AでのMBP-PICK1のリン酸化の割合を表にまとめた。

A PICK1非存在下



B PICK1存在下

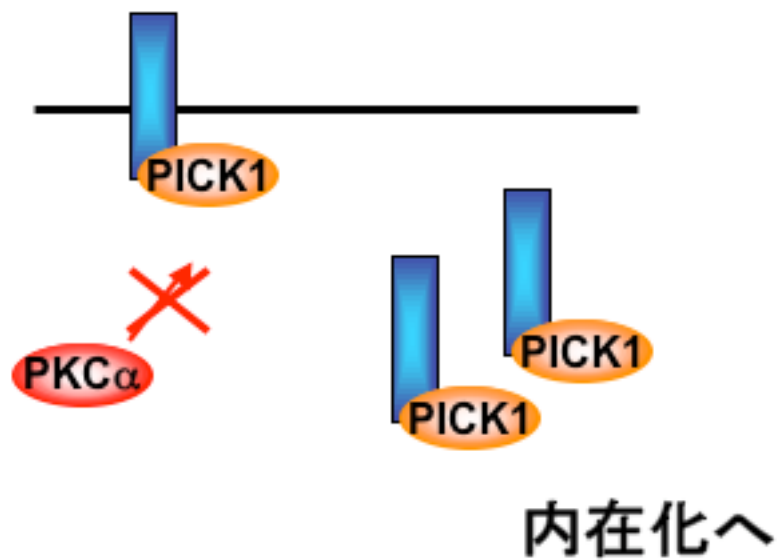


図36 LRP1Bの内在化のモデル

A. PICK1非存在下では、LRP1BはPKC活性化によりリン酸化され、LRP1Bの内在化が阻害される。

B. PICK1存在下では、LRP1BとPICK1間の結合によりPKC α によるリン酸化が阻害され、LRP1Bの内在化が促進される。

考察

LRP1B の発現

LRP1B 遺伝子は、P19 細胞のレチノイン酸の添加・凝集による神経分化誘導後 4 日目前後から発現し始める(図 1)。この時期は、神経細胞・グリア細胞・線維芽細胞へと分化できる細胞が混在している(Bain et al., 1994)。この LRP1B 遺伝子の発現は、P19 細胞の神経分化後まで上昇し続けた(図 1)。マウスでの LRP1B 遺伝子は、胎生期 15 日目前後から発現し始め、その後も発現が継続される(Li et al., 2005)。胎生期と P19 細胞の神経分化誘導での LRP1B 遺伝子の発現形式から、LRP1B 遺伝子は、神経分化の運命決定を担う遺伝子ではなく、むしろ神経細胞の維持に関わる遺伝子であると推察した。

本研究では、LRP1B 遺伝子の発現は、成体マウスの主要臓器の中では、脳に限局していることを示した(図 2)。マウスでの LRP1B 遺伝子の発現は、脳の各領域に加えて、若干唾液腺と甲状腺と精巣に限局した臓器で発現しているが、ヒトでの LRP1B 遺伝子の発現は、脳・副腎・唾液腺・精巣をはじめとした幅広い組織で見られた。この様に LRP1B 遺伝子の発現は、ヒトとマウス間において著しく違うことが報告された(Li et al., 2005)。このヒトでの LRP1B 遺伝子の発現形式は、LRP1B 遺伝子が、複数のガン細胞株での研究から、ガン抑制遺伝子候補であることに矛盾しないと考える。

LRP1B 遺伝子は、LDL 受容体ファミリーの中でも、LRP1 とタンパクの大きさ・構造上において酷似している(Herz and Bock, 2002)。LRP1 遺伝子は、胎生期初期から成体に及ぶまで恒常的に発現しており、中枢神経系の他に肝臓・心臓・腎臓・肺・膀胱など全身にわたり発現している。LRP1 遺伝子は、中枢神経系において胎生 12 日目前後に発現し始め、成体においても発現している。また、*in situ* hybridization 法を用いた mRNA レベルの組織学的な発現状況が報告されている(Bu et al., 1994) (Ishiguro et al., 1995)。LRP1 遺伝子は、成体の嗅球・大脳・小脳・脊椎に至るまで中枢神経系全体にわたり発現している。

本研究では、中枢神経系での LRP1B 遺伝子の機能を推察する目的で、*in situ* hybridization 法を行い、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子の mRNA の発現状況を比較した(図 3-5)。その結果、LRP1B 遺伝子と LRP1 遺伝子は共に、脳全体で発現しており、発現している細胞の多くは神経細胞であると推定された。このこと

から、成体マウスの神経細胞表面に存在する LRP1B の機能の 1 つは、アストロサイトやミクログリアで産生・分泌され、脳脊髄液中のリポ蛋白と結合したアポリポ蛋白 E を、神経細胞内に取り込む。そして、神経細胞損傷後の修復期に必要なコレステロールなどの脂質の神経細胞への輸送に関与していると考えた。両遺伝子の発現量の比較に関しては行っていない。海馬での興奮毒性障害後、神経細胞修復に関わる脂質の必要性から、アポリポ蛋白 E の発現量が増加するが、LRP1 の発現量の変化は観察されていない(Page et al., 1998)。このことから神経細胞が損傷した際、その修復に関わるアポリポ蛋白 E の受容体として機能するタンパクが、別に存在する可能性を有しており、これに LRP1B が関与している可能性もある。

LRP1B 遺伝子欠失マウス

LRP1B の生体内での機能を調べるために、LRP1B 遺伝子欠損マウスを作製した。LRP1B 遺伝子欠損マウスは正常に生まれ、外見的には異常は見られなかった。今回作製した LRP1B 遺伝子欠損マウスは、LRP1B の mRNA レベルでの発現が消失しているにも関わらず、組織学的・行動学的異常の発見には至らなかった。この結果は、2004 年の Marschang らの結果と一致する。彼らは、LRP1B の膜貫通ドメイン以降を欠失させる方法で、LRP1B 遺伝子欠損マウスを作製し、脳の組織学的解析・血漿中のリポタンパク代謝・シナプス可塑性に至るまで解析した結果、特に表現型は見られなかったと報告している。

マウスの脳内では、複数の LDL 受容体ファミリーが存在することが知られている(Hussain et al., 1999)。そのため LRP1B が欠失しても、他の LDL 受容体ファミリーが、その機能を補っている可能性がある。実際 LRP1B と LRP1 の細胞外リガンドや、細胞内ドメイン結合タンパクの大部分は、重複している(Marschang et al., 2004)。このことから、たとえ LRP1B が欠失しても、LRP1 による機能補填のために、LRP1B 遺伝子欠損マウスの表現型が見られないと考えた。この疑問は、LRP1 遺伝子欠損マウスが胎生 12 日目付近で致死になることから、解決できなかった。しかし、神経細胞特異的 LRP1 遺伝子欠損マウスが作製され、そのマウスは、組織学的異常を示さないが、運動亢進や振戦といった重篤な行動異常や運動異常を示した(May et al., 2004)。この結果から LRP1B は、LRP1 とは異なる機能を持つ(1)、或いは LRP1 の機能を一部補填する(2)と考えられる。

LRP1B と LRP1 の機能の違いは、内在化の研究において報告されており、LRP1 の内在化は迅速に起こるが、LRP1B の内在化は極めてゆっくりと起こる(Liu et al., 2001)。そしてこの結果は、(1)の可能性を指示している。

また LRP1 以外の LDL 受容体ファミリー或いは LDL 受容体ファミリーでないタンパクが、LRP1B 遺伝子欠損マウスでの、LRP1B の機能欠失を補っている可能性を排除できない。

LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパク

LRP1B の属している LDL 受容体ファミリーの機能は、既に解明されているシグナル伝達経路に加えて、報告されている LDL 受容体ファミリーの細胞内ドメインと結合するタンパクを考慮すると、多岐にわたることが推測できる(Herz, 2001) (Gotthardt et al., 2000)。また、LDL 受容体ファミリーの細胞内ドメインに結合するタンパクは、複数の他の LDL 受容体ファミリーにも結合することが報告されている(Gotthardt et al., 2000)。このことから、LRP1B の細胞内ドメインに結合するタンパクは、他の LDL 受容体ファミリーとも結合し、その下流のシグナル伝達経路に関与する可能性を有している。

そこで、LRP1B の細胞内ドメインに結合する新たなタンパクを検索するために、yeast two-hybrid スクリーニングを行った。yeast two-hybrid スクリーニングの結果、LRP1B 細胞内ドメインと結合する 6 つのタンパクを見つけた(表 1)。また、6 つの LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクすべてが、LRP1B との結合に関して未報告であった。JIP-1b と JIP-2 は、yeast two-hybrid アッセイと GST pulldown アッセイを用いた結合実験において、ApoER2, LRP1, Megalin の細胞内ドメインと結合することが報告されている(Stockinger et al., 2000) (Gotthardt et al., 2000) (Petersen et al., 2003)。一方、PICK1, RanBPM, Grb7, SNTG2 は、これまでに LDL 受容体ファミリーとの結合を報告されていない。

これまでに LRP1B の細胞内ドメインと結合するタンパクとして、PTB 或いは PDZ ドメインを持つタンパクが報告されている(Marschang et al., 2004)。今回 LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクとして同定した因子は、この両ドメインに加えて、SH3 や SPRY ドメインを持つものが含まれていた。

LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクの探索により、新規の LDL 受容体ファミリー結合タンパクを同定したことは、他の LDL 受容体ファミリーのシグナル伝

達経路の解明にも寄与できたと考える。

LDL 受容体ファミリーの細胞内ドメインに結合するタンパクは、複数の他の LDL 受容体ファミリーに結合することが報告されている(Gotthardt et al., 2000)。LRP1B の細胞内ドメインには、LRP1 の細胞内ドメインのもつすべてのモチーフが保存されており、同じタンパクが結合する可能性を持つ(図 10)。

これまでの報告どおり、JIP-1b と JIP-2 は、LRP1 の細胞内ドメインと結合した(表 2) (Gotthardt et al., 2000)。また PICK1 と RanBPM も同様に、LRP1 の細胞内ドメインに結合したが、Grb7 と SNTG2 は、LRP1 の細胞内ドメインに結合に結合しない(表 2)。この結果は、JIP-1b, JIP-2, PICK1 と RanBPM は、LRP1 と協調して、それぞれの下流に存在するシグナル伝達経路を調整している可能性を示唆した。一方、Grb7 と SNTG2 は、LRP1B 特異的に、或いは他の受容体と共働して、それぞれの下流のシグナルを調整している可能性を示唆した。

yeast two-hybrid アッセイにより、複数の LRP1B 変異体を用いて、LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパク候補の結合部位を調べることで、結合の可能性を強めた(図 13, 17, 25, 26, 29)。そして、複数個のクローンが得られた JIP-1b, PICK1, RanBPM は、LRP1B 或いは LRP1 との結合を、哺乳類細胞における *in vivo* の免疫沈降法を用いて確認した(図 11, 16, 27)。

JIP-1b は、ストレス応答 MAP キナーゼである JNK 経路の構成因子の 1 つである。JNK は、放射線・紫外線・抗癌剤・高浸透圧・熱ショックなどのさまざまな物理化学的ストレスにより、活性化される。JNK 経路は、細胞外からの刺激を核に伝達し、遺伝子発現を調節することで、ストレス適応・アポトーシスなどを制御する。JIP-1b は、MAPK の JNK1/2/3、JNK を活性化する MAPKK の MKK4/7、MAPKKK の MLK2/3, DLK (MAPK upstream kinase)などと結合することが知られており、そのシグナルの活性化や集合体形成を調節する足場タンパクである(Yoshioka, 2004)。本研究では、LRP1B 或いは LRP1 と JIP-1b 間の結合が、JNK 経路に影響を与えるかを検討した。しかし、少なくとも HEK293T 細胞に過剰発現した条件下では、LRP1B 或いは LRP1 は JNK 経路に関与しなかった(図 14, 15)。

シナプス部位に必要な膜タンパクを、小胞として輸送する KLC (kinesin light

chain)は、微小管と直接結合する KHC (Kinesin heavy chain)とともに、軸索中でのタンパク輸送に関与する微小管伝達輸送因子 KinesinI を形成する(Schnapp et al., 2003)。JIP-1b のカルボキシル末端は、KLC と結合し、また JIP-1b の PTB ドメインは、LDL 受容体ファミリーの ApoER2 と結合する(Verhey et al., 2001) (Stockinger et al., 2000)。実際これらは、ApoER2 –JIP-1b –KLC の複合体を形成し、神経細胞の末端に輸送される(Verhey et al., 2001)。このことから JIP-1b は、キネシン依存の軸索輸送により、ApoER2 などの積荷受容体とともに小胞顆粒を、神経細胞の末端に輸送することを期待されている。そこで LRP1B と JIP-1b の結合の 1 つの機能として、小胞顆粒の軸索輸送を担う可能性がある。

RanBPM は、受容体型チロシンカイネースである MET と結合することにより、MET のリガンドである HGF の非存在下においても、Ras-ERK 経路を恒常活性化させるとの報告や、逆に、神経接着分子である L1 により活性化される ERK 経路を阻害すると報告がある(Wang et al., 2002) (Cheng et al., 2005)。いずれも RanBPM が、ERK 経路を調節している可能性を示唆されている。ERK は、増殖因子により活性化される。ERK 経路は、癌遺伝子 Ras の下流で働くシグナル伝達経路であり、細胞外からの刺激を核に伝達し、遺伝子発現を調節することで、細胞増殖・細胞分化などを制御する。まず本研究では、RanBPM、LRP1B、LRP1 が、ERK 経路に影響を与えるかを検討した。COS7 細胞と HEK293T 細胞で、下流のシグナル経路の活性が大いに異なる結果を示した(図 18-22)。また HEK293T 細胞において、LRP1B が、若干ながら ERK 経路を正に調節した(図 21, 22)。次に本研究では、LRP1B (或いは LRP1)と RanBPM 間の結合が、ERK 経路に影響を与えるかを検討した。しかし、LRP1B (或いは LRP1)と RanBPM 間の結合は、ERK 経路に関与しなかった(図 19, 21)。

また RanBPM は、AR や THR などの複数の核内受容体と結合し、その下流の転写を調節するコアクチベーターとして機能すると報告がある(Rao et al., 2002) (Poirier et al., 2006)。そして LRP1B と LRP1 は、 γ -secretase 複合体による膜内タンパク分解を受けた後、細胞内ドメインが核内に移行すると報告(Liu et al., 2007a) (May et al., 2002)があることから、LRP1B(或いは LRP1)の細胞内ドメインは、RanBPM と核内で結合し、転写を調節することなどが期待される。まず本研究では、LRP1B 細胞内ドメイン(或いは LRP1 細胞内ドメイン)が、遺伝子発現に関与するのかを検討したが、いずれも関与しなかった(図 23)。次に本研

究では、LRP1B 細胞内ドメイン(或いは LRP1 細胞内ドメイン)と RanBPM 間の結合により、RanBPM が、コアクチベーターとして機能することで、転写活性を誘導することを期待したが、いずれも転写活性に関与しなかった(図 24)。APP は、LRP1B や LRP1 と同様に γ -secretase 複合体により膜内タンパク分解が起こり、結果的にカルボキシル末端断片(AICD)を生じる。この AICD は、AICD-*FE65*-*Tip60* の複合体を形成して初めて転写促進能を持つ (Cao et al., 2001)。したがって、LRP1B 細胞内ドメイン(或いは LRP1 細胞内ドメイン)による転写調節には、他の因子を必要としている可能性もある。

LRP1B と RanBPM の結合に関して、LRP1B の結合モチーフの変異体や各エクソンを単独で発現させた bait を用いた yeast two-hybrid アッセイを行ったが、具体的な結合部位の同定には至らなかった。RanBPM のもつ SPRY ドメインは、特定の配列を認識して結合するのではなく、標的分子の立体構造を認識して結合することが報告されており、これと一致する結果となった(Woo et al., 2006)。

Grb7 は、受容体型チロシンキナーゼやシグナル分子と結合しており、細胞内シグナルの中継地点として機能する(Han et al., 2001)。Grb7 の生理的機能は、Grb7 の過剰発現が細胞移動を刺激することや、Grb7-FAK 複合体形成が食道ガンでの浸潤の増加と相関するとの報告がある(Tanaka et al., 1997) (Shen et al., 2002)。LRP1B 遺伝子は、高頻度に様々なガン細胞株で欠失しており、その欠失と腫瘍の異形度との関連性が報告されている。LRP1B と Grb7 はともに、細胞遊走の調節や腫瘍進行度に関係していることから、両者の結合が、細胞遊走を調節していることが期待できる。

LRP1B と Grb7 の結合に関して、Grb7 は、LRP1B のエクソン 91 にある NPxY モチーフ変異体と結合しなかった(図 25)。Grb7 の SH2 ドメインの結合コンセンサス配列が報告されており、チロシン残基のリン酸化の有無に関わらず、Tyr-X-Asn である(Han et al., 2001) (Pero et al., 2002)。LRP1B 細胞内ドメイン exon91 の NPxY モチーフの前後の配列は、Tyr-Ser-Asn-Pro-Val-Tyr-Ala-Lys であるため、Grb7 の SH2 ドメインの結合コンセンサス配列と一致する。また、LRP1 の 2 番目の NPxY モチーフの前後は、Phe-Thr-Asn-Pro-Val-Tyr-Ala-Thr であるため、Grb7 の SH2 ドメインの結合コンセンサス配列と一致しないことから、Grb7 は、LRP1B のみに結合すると考えた。

SNTG2 は、細胞膜表面に局在し、複数のタンパク結合ドメインをもつタンパクである (Piluso et al., 2000) (Alessi et al., 2006)。SNTG2 が属するシントロフィニンファミリーは、ジストロフィンの以外にもシグナルタンパクなどと結合し、シグナルタンパクを筋細胞膜やジストロフィン関連タンパク複合体へと結びつける足場タンパクであると考えられている (Piluso et al., 2000) (Ehmsen et al., 2002) (Alessi et al., 2006)。LRP1B は、細胞膜に局在する膜タンパクであるため、LRP1B と SNTG2 の結合は、ジストロフィン関連タンパク複合体を、細胞膜付近に固定することを期待できる。

PICK1 は、グルタミン酸受容体の内在化を調節することにより、シナプス可塑性などの神経機能に関与していることが知られている(Steinberg et al., 2006)。GluR2 は、GRIP により神経細胞膜上に、安定化されている。PKC による GluR2 のクラス II 結合モチーフ内の Ser 残基が、リン酸化を受けると、GluR2 と GRIP 間の結合が、解離される。この GluR2 と GRIP の解離が、GluR2 と PICK1 の結合を促し、結果的に、GluR2 のクラスリン依存的な内在化が起こることが示唆されている (Matsuda et al., 1999) (Matsuda et al., 2000) (Perez et al., 2001)。一方 LRP1B の内在化は、クラスリン依存的な内在化シグナルである NPxY モチーフの認識により起こることが報告されているが、詳細なメカニズムは、不明である(Knisely et al., 2007)。そこで PKC の活性化が、LRP1B の内在化に影響するかを検討した。その結果、LRP1B の内在化は、PKC の活性化剤である TPA の添加により阻害された(図 31)。さらに PICK1 が、LRP1B の内在化に影響するかを検討した。その結果、LRP1B の内在化は、PICK1 存在下で亢進した(図 31)。

また PICK1 は、mGLUR7 と結合することにより、mGLUR7 の PKC によるリン酸化を阻害する(Dev et al., 2000)。この様に PICK1 は、間接的に PKC によるシグナル伝達を調節している可能性がある。LRP1 の細胞内ドメインにあるセリン・スレオニン・チロシン残基は、リン酸化されることが知られている。PKA (protein kinase A)や PKC α や src ファミリーによる LRP1 の細胞内ドメインのリン酸化は、リン酸化部位の変異体を用いた実験から、自身の内在化の速度や、細胞内ドメインに結合するタンパクとの結合に変化をきたすことから、機能的に重要であると考えられる。(Li et al., 2001) (Ranganathan et al., 2004) (Loukinova et al., 2002)。また LRP1 以外にも、細胞表面受容体のリン酸化が、その受容体の輸送やシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしていることが広く知られてい

る。はじめに LRP1B の細胞内ドメインのリン酸化を検討したところ、LRP1B の細胞内ドメインは、PKC α により *in vitro* でリン酸化された(図 32)。この結果は、LRP1B は LRP1 と同様細胞内でリン酸化されていることを期待できる。LRP1 の主なセリン・スレオニン残基のリン酸化サイトは、LRP1B においても保存されている(Ranganathan et al., 2004)。次に LRP1B と PICK1 間の結合が、LRP1B の細胞内ドメインのリン酸化を調節するかを検討した結果、LRP1B の細胞内ドメインのリン酸化は、PICK1 の添加により、有意に減少した(図 33A, 34A,E)。そして、PICK1 添加による LRP1B の細胞内ドメインのリン酸化の減少は、PICK1 に結合できない LRP1B の細胞内ドメイン変異体では起こらなかったことから、LRP1B と PICK1 間の結合により、LRP1B の細胞内ドメインのリン酸化の減少が生じたと考えられる(図 33B, 34B,E)。また報告されている通り、*in vitro* で LRP1 の細胞内ドメインは、PKC α によりリン酸化された(図 32)。しかし興味深いことに、LRP1 は、PICK1 と結合するにも関わらず、LRP1 細胞内ドメインのリン酸化は、PICK1 により阻害されない(図 34C-E)。この結果より、LRP1 と PICK1 間の結合と LRP1B と PICK1 間の結合が、異なる意味を持つことを示している。LDL 受容体ファミリーを含む一回膜貫通型タンパクは、主に共働受容体として機能することが知られている。LRP1B は、細胞膜上において、リガンドである uPA-PAI を介して、uPAR と複合体を形成しており、これら複合体のエンドサイトーシスを担う(Liu et al., 2001) (Li et al., 2002)。このことから LRP1B のリン酸化の変化は、LRP1B 自身の内在化だけでなく、共働受容体の内在化にも変化を及ぼし得る。

PICK1 は、アミノ末端にタンパク結合モチーフである PDZ ドメイン、カルボキシル末端に二量体形成ドメインである BAR ドメインを持っている。実際 PICK1 は、BAR ドメインを介してホモ二量体を形成し、PDZ ドメインを介してイオンチャネル型や代謝型のグルタミン酸受容体と結合する。このことから、LRP1B (或いは LRP1) は、PICK1 を介して、グルタミン酸受容体と結合している可能性がある。この可能性は、LRP1B (或いは LRP1) が、グルタミン酸受容体の共働受容体として、細胞表面にあるグルタミン酸受容体量の調節や、神経細胞のシナプス末端へのグルタミン酸受容体の輸送に関与することを期待できる。

LRP1B 細胞内ドメイン内の選択的スプライシングの意義

発生段階や組織などの環境に応じて、時間的・空間的に選択的スプライシングを制御することによってアイソフォームを作り分けている例も知られており、選択的スプライシングは、重要な意味を持っている。ApoER2 の細胞内ドメインは、選択的スプライシングを生じ、アイソフォーム間で結合タンパクとの結合能を変化させている(Kim et al., 1997) (Sun et al., 1999) (Stockinger et al., 2000)。LRP1B の細胞内ドメインは、ApoER2 と同様に、選択的スプライシングを生じるが、この生理的意義は、報告されていない。

興味深いことに、JIP-1b と JIP-2 は、ApoER2 と同様に、LRP1B の細胞内ドメインが完全長のアイソフォーム(exon89-91)には結合するが、エクソン 90 を欠くアイソフォーム(exon89,91)には、結合しなかった(表 2)。マウス LRP1B は、脳の各領域に加えて、若干唾液腺と甲状腺と精巣に局限した臓器で発現しているが、LRP1B の細胞内ドメイン完全長のアイソフォームは、脳特異的である(Marschang et al., 2004)。また JIP-1b と JIP-2 は、脳と精巣で発現している(Dickens et al., 1997) (Stockinger et al., 2000)。このことから、LRP1B と JIP-1b 或いは JIP-2 は、脳と精巣の両方で発現しているが、脳特異的に結合することが示唆され、臓器特有のシグナル伝達が行われることを期待できる。また SNTG2 も、LRP1B の細胞内ドメインが完全長のアイソフォームには結合するが、エクソン 89 と 91 から構成されるアイソフォームには、結合しなかった(表 2)。これまで、LRP1B の選択的スプライシングによる影響は、報告されていなかった。今回の結果は、LRP1B の選択的スプライシングが、LRP1B 細胞内ドメイン結合タンパクとの結合に影響を及ぼす可能性を示した。そして、組織など環境に応じて結合タンパクを変化させ、下流のシグナル伝達経路を調節している可能性がある。以上から、LRP1B 細胞内ドメインの選択的スプライシングの重要性が示された。

今回、LRP1B の細胞内ドメインに結合するタンパクを見つけたことにより、新規の LDL 受容体ファミリー結合タンパクを同定した。この結果は、LDL 受容体ファミリーの担うシグナル伝達の可能性をさらに広げた。また、*in vitro* での PKC α による LRP1B 細胞内ドメインのリン酸化は、PICK1 との結合により調節されており、LRP1B と PICK1 間の結合が、LRP1B の内在化やシグナル伝達に影響を及ぼす可能性を有する。実際 LRP1B の内在化は、PKC の活性により阻害さ

れ、PICK1 の存在下で促進された(図 36)。

謝辞

本研究を行うにあたり、最高の環境を与えてくださるとともに、直接ご指導賜りました動物遺伝子機能学講座 川市正史教授に心から感謝いたします。また、研究を進めるに際し、ご指導いただきました岡千緒助教、ご助言を賜りました石田靖雅准教授、松田永照助教ならびに動物遺伝子機能学講座の皆様にお礼申し上げます。

また、遺伝子欠損マウス作製の際にご指導とご協力いただきました現京都大学再生医科学研究所の山中伸弥教授、一阪朋子さん、現動物細胞工学講座の飯田純子さんに心から感謝申し上げます。また、動物飼育実験施設の利用にあたり技官の小澤珠代さん、KACの方々のおかげで、快適に動物舎を利用することができました。ありがとうございました。

リン酸化に関する研究の際にご指導いただきました細胞内情報学講座の多胡憲治助教、JNK シグナルに関する研究の際にご助言いただきました北里大学の伊藤道彦准教授、ERK シグナルに関する研究の際にご助言いただきました現京都大学再生医科学研究所の高橋和利助教にお礼申し上げます。

最後に、これまで私を支えてくれた家族に感謝します。

参考文献

Alessi, A., Bragg, A. D., Percival, J. M., Yoo, J., Albrecht, D. E., Froehner, S. C., and Adams, M. E. (2006). γ -Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the α/β syntrophins. *Exp. Cell Res.* 312, 3084-3095.

Andersen, O.M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C.A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu X., Bales, K.R., Cappai, R., Masters, C.L., Gliemann, J., Mufson, E.J., Hyman, B.T., Paul, S.M., Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13461–13466.

Bain, G., Ray, W.J., Yao, M., and Gottlieb D.I. (1994). From Embryonal Carcinoma Cells to Neuron: The P19 Pathway. *BioEssays.* 16, 343-348.

Balkovetz DF and Lipschutz JH. (1999). Hepatocyte growth factor and the kidney: it is not just for the liver. *Int Rev Cytol* 186: 225–260.

Beffert, U., Stolt, P.C., and Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J Lipid Res* 45, 403-409.

Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.P., Richard G.W., Anderson, R.G., and Herz, J. (2003). LRP: Role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 300, 329–332.

Bu, G., Maksymovitch, E.A., Nerbonne, J.M., and Schwartz, A.L. (1994). Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J. Biol. Chem.* 269, 18521-18528.

Cao, X., and Südhof T.C. (2001). A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. *Science*, 293, 115-120.

Cheng, L., S. Lemmon, and V. Lemmon. (2005). RanBPM is an L1-interacting protein

that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurochem.* 94, 1102–1110.

Chung, H.J., Steinberg, J.P., Huganir, R.L. and Linden, D.J. (2003). Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science* 300, 1751–1755.

Chung, H.J., Xia, J., Scannevin, R.H., Zhang, X. and Huganir, R.L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci* 20, 7258–7267.

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M. and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24,471 -479.

Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du, Y.S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., Spijkers, P., Guo, H., Song, X., Lenting, P.J, Van Nostrand, W.E., and Zlokovic, B. V. (2004). LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms. *Neuron* 43, 333–344.

Dev, K.K., Nakajima, H., Kitano, J., Braithwaite, S.P., Henley, J.M., and Nakanishi, S. (2000). PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGluR7. *J. Neurosci.* 20, 7252-7257.

Dev, K.K., Nakanishi, S., and Henley, J.M. (2004). The PDZ domain of PICK1 differentially accepts protein kinase C- α and GluR2 as interacting ligands. *J. Biol. Chem.* 279, 41393–41397.

Dickens, M., Rogers, J.S., Cavanagh, J. Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J.R., Greenberg, M.E., Sawyers, C.L., and Davis, R.J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*, 277, 693-696.

Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain:

Molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067–1076.

Ehmsen, J., Poon, E. and Davies, K. (2002). The dystrophin-associated protein complex. *J. Cell Sci.* 115, 2801-2803.

Frykman, P.K., Brown, M.S., Yamamoto, T., Goldstein, J.L., and Herz, J. (1995). Normal Plasma Lipoproteins and Fertility in Gene-Targeted Mice Homozygous for a Disruption in the Gene Encoding Very Low Density Lipoprotein Receptor. *PNAS*, 92, 8453-8457.

Fujino, T., Asaba, H, Kang, M.J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D.H., Ioka, R.X., Ono, M., Tomoyori, H., Okubo, M., Murase, T., Kamataki, A., Yamamoto, J., Magoori, K., Takahashi, S., Miyamoto, Y., Oishi, H., Nose, M., Okazaki, M., Usui, S., Imaizumi, K., Yanagisawa, M., Sakai, J., and Yamamoto, T.T. (2003). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 229-234.

Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J., and Herz, J. (2000). Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 275, 25616-25624.

Han, D.C., Shen, T.L. and Guan, J.L. (2001). The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene* 20, 6315-6321.

He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677.

Herz, J. (2001). The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron*. 29, 571–581.

Herz, J., and Bock, H.H. (2002). LIPOPROTEIN RECEPTORS IN THE NERVOUS SYSTEM. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 405-434

Herz, J., and Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 7, 850–859.

Herz, J., Clouthier, D.E., and Hammer, R.E. (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71, 411-421.

Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., and Herz, J. (1999). Direct binding of reelin to VLDL receptor and apoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron.* 24, 481–489.

Hirbec, H., Perestenko, O., Nishimune, A., Meyer, G., Nakanishi, S., Henley, J. M. and Dev, K. K. (2002). The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs. *J. Biol. Chem.* 277, 15221-15224.

Hubank, M., and Schatz, D.G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 5640-5608.

Hussain, M.M., Strickland, D.K., and Bakillah, A. (1999). The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.* 19,141 -172.

Inomata, H., Nakamura, Y., Hayakawa, A., Takata, H., Suzuki, T., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (2003). A scaffold protein JIP-1b enhances amyloid precursor protein phosphorylation by JNK and its association with kinesin light chain 1. *J Biol Chem.* 278, 22946-22955.

Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., and Herz, J.

(1993). Hypercholesterolemia in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice and its Reversal by Adenovirus-mediated Gene Delivery. *J. Clin. Invest.* 92, 883-893.

Ishiguro, M., Imai, Y. and Kohsaka, S. (1995). Expression and distribution of low density lipoprotein receptor-related protein mRNA in the rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 33, 37 -46.

Johnson, E. B., Hammer, R. E. and Herz, J. (2005). Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3523 -3538.

Kang, D.E., Pietrzik, C.U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D.E., Kounnas, M.Z., Wagner, S.L., Troncoso, J.C., Kawas, C.H., Katzman, R., Koo, E.H. (2000). Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J. Clin. Invest.* 106, 1159-1166.

Kang, D.E., Saitoh, T., Chen, X., Xia, Y., Masliah, E., Hansen, L.A., Thomas, R.G., Thal, L.J., and Katzman, R. (1997). Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 49,56-61.

Kato, M., Patel, M. S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B. H., Glass, D. A. II, Hartmann, C., Li, L., Hwang, T. H., Brayton, C. F., Lang, R. A., Karsenty, G. and Chan, L. (2002). *Cbfa1*-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* 157, 303 -314.

Kennelly, P.J., and Krebs, E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266, 15555–15558.

Kim, D.H., Magoori, K., Inoue, T.R., Mao, C.C., Kim, H.J., Suzuki, H., Fujita, T., Endo, Y., Saeki, S., and Yamamoto, T.T. (1997). Exon/intron organization, chromosome

localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J Biol Chem.* 272, 8498–8504.

Knauer, M.F., Orlando, R.A., and Glabe, C.G. (1996). Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* 740, 6-14.

Knisely, J.M., Li, Y., Griffith, J.M., Geuze, H.J., Schwartz, A.L., and Bu, G. (2007). Slow endocytosis of the LDL receptor-related protein 1B: Implications for a novel cytoplasmic tail conformation. *Exp. Cell Res.* 313, 3298-3307.

Kounnas, M.Z., Moir, R.D., Rebeck, G.W., Bush, A.I., Argraves, W.S., Tanzi, R.E., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional apoE receptor, binds secreted β -amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82, 331-340.

Langbein, S., Szakacs, O., Wilhelm, M., Sukosd, F., Weber, S., Jauch, A., Beltran, A.L., Alken, P., Kälble, T., and Kovacs, G. (2002). Alteration of the LRP1B gene region is associated with high grade of urothelial cancer. *Lab Investig*, 82, 639-643.

Li, Y., Knisely, J.M., Lu, W., McCormick, L.M., Wang, J., Henkin, J., Schwartz, A.L., and Bu, G. (2002). Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1B impairs urokinase receptor regeneration on the cell surface and inhibits cell migration. *J Biol Chem* 277, 42366–42371.

Li, Y., Lu, W., and Bu, G. (2005). Striking differences of LDL receptor-related protein 1B expression in mouse and human. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 868-873.

Li, Y., van Kerkhof, P., Marzolo, M.P., Strous, G.J., and Bu, G. (2001). Identification of a major cyclic AMP-dependent protein kinase A phosphorylation site within the cytoplasmic tail of the low-density lipoprotein receptor-related protein: implication for receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1185-1195.

Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E., and Strickland, D. K. (2008). LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 88, 887-918.

Liu, C.X., Li, Y., Obermoeller-McCormick, L.M., Schwartz, A.L., and Bu, G. (2001). The putative tumor suppressor LRP1B, a novel member of the low density lipoprotein (LDL) receptor family, exhibits both overlapping and distinct properties with the LDL receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 276, 28889-28896.

Liu, C.X., Musco, S., Lisitsina, N.M., Forgacs, E., Minna, J.D., and Lisitsyn, N.A. (2000b). LRP-DIT, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 60, 1961-1967.

Liu, C.X., Musco, S., Lisitsina, N.M., Yaklichkin, S.Y., and Lisitsyn, N.A. (2000a). Genomic organization of a new candidate tumor suppressor gene, LRP1B. *Genomics*, 69, 271-274

Liu, C.X., Ranganathan, S., Robinson, S., and Strickland, D.K. (2007a). Gamma-secretase-mediated release of the low density lipoprotein receptor-related protein 1B intracellular domain suppresses anchorage-independent growth of neuroglioma cells. *J Biol Chem*, 282, 7504-7511.

Liu, Q., Zerbinatti, C.V., Zhang, J., Hoe H.S., Wang, B., Cole, S.L., Herz, J., Muglia, L., and Bu, G. (2007b). Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56, 66–78.

Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M.M., Loukinov, D., Ulery, P.G., Mikhailenko, I., Lawrence, D.A., and Strickland, D.K. (2002). Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J. Biol. Chem* 277, 15499–15506.

Madsen, K.L., Beuming, T., Niv, M.Y., Chang, C.-W., Dev, K.K., Weinstein, H., and

Gether, U. (2005). Molecular determinants for the complex binding specificity of the PDZ domain in PICK1. *J. Biol. Chem.* 280, 20539–20548.

Margolis, B., Silvennoinen, O., Comoglio, F., Roonprapunt, C., Skolnik, E., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1992). High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8894–8898.

Marschang, P., Brich, J., Weeber, E.J., Sweatt, J.D., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Hammer, R.E., and Herz, J. (2004). Normal development and fertility of knockout mice lacking the tumor suppressor gene LRP1b suggest functional compensation by LRP1. *Mol. Cell. Biol.* 24,3782 -3793.

Matsuda, S., Launey, T., Mikawa, S., and Hirai, H. (2000). Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *EMBO J* 19, 2765–2774.

Matsuda, S., Mikawa, S., and Hirai, H. (1999). Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *J Neurochem* 73, 1765–1768.

May, P., Reddy, Y.K., and Herz, J. (2002). Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J. Biol. Chem.* 277, 18736–18743.

May, P., Rohlmann, A., Bock, H. H., Zurhove, K., Marth, J. D., Schomburg, E. D., Noebels, J. L., Beffert, U., Sweatt, J. D., Weeber, E. J. et al. (2004). Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8872-8883.

Mcburney, M.W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Biol.* 37, 135-140.

Nakagawa, T., Pimkhaokham, A., Suzuki, E., Omura, K., Inazawa, J., Imoto, I. (2006).

Genetic or epigenetic silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 97, 1070-1074.

Orr, A.W., Elzie, C.A., Kucik, D.F., and Murphy-Ullrich, J.E. (2003a). Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116, 2917–2927.

Orr, A.W., Pedraza, C.E., Pallero, M.A., Elzie, C.A., Goicoechea, S., Strickland, D.K., and Murphy-Ullrich, J.E. (2003b). Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J. Cell Biol.* 161, 1179–1189.

Page, K.J., Hollister, R.D., and Hyman, B.T. (1998). Dissociation of apolipoprotein and apolipoprotein receptor response to lesion in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 85, 1161–1171.

Perez, J.L., Khatri, L., Chang, C., Srivastava, S., Osten, P., and Ziff, E.B. (2001). PICK1 targets activated protein kinase C-alpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *J Neurosci* 21, 5417–5428.

Pero, S.C., Oligino, L., Daly, R.J., Soden, A.L., Liu, C., Roller, P.P., Li, P., and Krag, D.N. (2002). Identification of novel non-phosphorylated ligands, which bind selectively to the SH2 domain of Grb7. *J Biol Chem.* 277, 11918–11926.

Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). *Science* 303, 495–499.

Petersen, H.H., Hilpert, J., Militz, D., Zandler, V., Jacobsen, C., Roebroek, A.J., and Willnow, T.E. (2003). Functional interaction of megalin with the megalin binding protein (MegBP), a novel tetratricopeptide repeat-containing adaptor molecule. *J. Cell Sci.* 116, 453-461.

Piluso, G., Mirabella, M., Ricci, E., Belsito, A., Abbondanza, C., Servidei, S., Puca, A.A., Tonali, P., Puca, G.A., and Nigro, V. (2000). Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15851–15860.

Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. and Skarnes, W. C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407,535 -538.

Poirier, M.B., Laflamme, L., and Langlois, M.F. (2006). Identification and characterization of RanBPM, a novel coactivator of thyroid hormone receptors. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 313 - 325.

Qiu, Z., Strickland, D., Hyman, B., and Rebeck, G. (1999). Alpha2-macroglobulin enhances the clearance of endogenous soluble beta amyloid peptide via the low-density lipoprotein receptor-related protein in cortical neurons. *J Neurochem.* 73,1393-1398.

Ranganathan, S., Liu, C.X., Migliorini, M.M., Von Arnim, C.A., Peltan, I.D., Mikhailenko, I., Hyman, B. T., and Strickland, D.K. (2004). Serine and Threonine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein by Protein Kinase C Regulates Endocytosis and Association with Adaptor Molecules. *J. Biol. Chem.* 279, 40536-40544.

Rao, M.A., Cheng, H., Quayle, A.N., Nishitani, H. Nelson, C.C. and Rennie, P.S. (2002). RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 48020–48027.

Roebroek, A. J., Reekmans, S., Lauwers, A., Feyaerts, N., Smeijers, L., and Hartmann, D. (2006). Mutant Lrp1 knock-in mice generated by recombinasemediated cassette exchange reveal differential importance of the NPXY motifs in the intracellular domain of LRP1 for normal fetal development. *Mol. Cell. Biol.* 26, 605-616.

Schaefer, A.W., Kamiguchi, H., Wong, E.V., Beach, C.M., Landreth, G. and Lemmon,

V. (1999). Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J. Biol. Chem.* 274, 37965–37973.

Schnapp, B.J. (2003). Trafficking of signaling modules by kinesin motors. *J. Cell Sci.* 116, 2125-2135.

Seidenman, K.J., Steinberg, J.P., Huganir, R. and Malinow, R. (2003). Glutamate receptor subunit 2 Serine 880 phosphorylation modulates synaptic transmission and mediates plasticity in CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 23, 9220–9228.

Seki, N., Bujo, H., Jiang, M., Tanaga, K., Takahashi, K., Yagui, K., Hashimoto, N., Schneider, W.J., and Saito, Y. (2005). LRP1B is a negative modulator of increased migration activity of intimal smooth muscle cells from rabbit aortic plaques. *Biochem Biophys Res Commun.* 331, 964–970.

Shen, T.L., Han, C.H., and Guan, J.L. (2002). Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration. *J Biol Chem* 277, 29069–29077.

Sonoda, I., Imoto, I., Inoue, J., Shibata, T., Shimada, Y., Chin, K., and Inazawa, J. (2004). Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 64, 3741–3747.

Staudinger, J., Lu, J., and Olson, E.N. (1997). Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with the COOH terminus of protein kinase C- α . *J. Biol. Chem.* 272, 32019–32024.

Staudinger, J., Zhou, J., Burgess, R., Elledge, S.J. and Olson, E.N. (1995). PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J Cell Biol* 128, 263–271.

Steinberg, J.P., Takamiya, K., Shen, Y., Xia, J., Rubio, M.E., Yu, S., Jin, W., Thomas, G.M., Linden, D.J., and Huganir, R.L. (2006). Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression. *Neuron*, 49, 845–860.

Songyang, Z., Fanning, A., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S., Chishti, A., Crompton, A., Chan, A., Anderson, J., and Cantley, L. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73–77.

Stockinger, W., Brandes, C., Fasching, D., Hermann, M., Gotthardt, M., Herz, J., Schneider, W.J., and Nimpf, J. (2000). The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 275,25625 -25632.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1977-1981.

Sun, X.M., and Soutar, A.K. (1999). Expression in vitro of alternatively spliced variants of the messenger RNA for human apolipoprotein E receptor-2 identified in human tissues by ribonuclease protection assays. *Eur J Biochem.* 262, 230–239.

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., and He, X.. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 407, 530–535.

Tanaga, K., Bujo, H., Zhu, Y., Kanaki, T., Hirayama, S., Takahashi, K., Inoue, M., Mikami, K., Schneider, W.J., and Saito, Y. (2004). LRP1B attenuates the migration of smooth muscle cells by reducing membrane localization of urokinase and PDGF receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 1422–1428.

Tanaka, S., Mori, M., Akiyoshi, T., Tanaka, Y., Mafune, K., Wands, J.R., and Sugimachi, K. (1997). Coexpression of Grb7 with epidermal growth factor receptor or

Her2/erbB2 in human advanced esophageal carcinoma. *Cancer Research* 57 28–31.

Terashima, A., Cotton, L., Dev, K.K., Meyer, G., Zaman, S., Duprat, F., Henley, J.M., Collingridge, G.L., and Isaac, J.T. (2004). Regulation of synaptic strength and AMPA receptor subunit composition by PICK1. *J Neurosci* 24, 5381–5390.

Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A. and Herz, J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689 -701.

Ulery, P.G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R.E., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. (2000). Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 275, 7410–7415.

Verhey, K.J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B.J., Rapoport, T.A., and Margolis, B. (2001). Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J. Cell Biol.* 152, 959-970.

Wang, D., Z. Li, E.M. Messing, and G. Wu. (2002). Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J. Biol. Chem.* 277, 36216–36222.

Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R.J. (1998). A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281, 1671–1674.

Whitmarsh, A.J., Kuan, C.Y., Kennedy, N.J., Kelkar, N., Haydar, T.F., Mordes, J.P., Appel, M., Rossini, A.A., Jones, S.N., Flavell, R.A., Rakic, P., and Davis, R.J. (2001). Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* 15, 2421-2432.

Willnow, T. E., Hilpert, J., Armstrong, S. A., Rohlmann, A., Hammer, R. E., Burns, D.

K., and Herz, J. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8460-8464.

Woo, J.S., Imm, J.H., Min, C.K., Kim, K.J., Cha, S.S., and Oh, B.H. (2006). Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J.* 25, 1353–1363.

Xia, J., Chung, H.J., Wihler, C., Huganir, R.L., and Linden, D.J. (2000). Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins. *Neuron* 28, 499–510.

Yang, D.S., Small, D.H., Seydel, U., Smith, J.D., Hallmayer, J., Gandy, S.E., Martins, R.N. (1999). Apolipoprotein E promotes the binding and uptake of β -amyloid into Chinese hamster ovary cells in an isoform-specific manner *Neuroscience* 90,1217-1226.

Yasuda, J., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sharma, M., and Davis, R.J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7245–7254.

Yokoyama, N., N. Hayashi, T. Seki, N. Pante, T. Ohba, K. Nishii, K. Kuma, T. Hayashida, T. Miyata, U. Aebi, M. Fukui, and T. Nishimoto. (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature.* 376, 184-188.

Yoshioka, K. (2004). Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *J. Biochem.* 135, 657–661.

Zhu, Y., and Hui D.Y. (2006). Hypertriglyceredemia in LR11 –deficiency mice. *FASEB J* 20, A84.

赤沼安夫、脊山洋右、永山克孝、山本章 編集 (1993). 中性脂質とリポタンパク質 東京化学同人

上口裕之 (2000). 神経接着分子による軸索成長円錐の運動制御 蛋白核酸酵素 45, 1735-1741.

小林泰浩、高橋直之 (2006). LRP/Wntと骨代謝 骨粗鬆症治療 5, 186-189.